

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. S. Endres

Charakterisierung von CRIF1 als Regulator der angeborenen antiviralen Immunität

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Lukas August Macke
aus Rosenheim
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Burger
Prof. Dr. med. U. Ködel

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Schmidt
Dr. rer. nat. Christian Wißkirchen

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die zwei Säulen des humanen Immunsystems.....	1
1.1.1	Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Antigenspezifität des adaptiven Immunsystems	2
1.2	Das angeborene Immunsystem gegen Virusinfektionen	3
1.2.1	Viruserkennung durch die Wirtszelle.....	3
1.2.2	Antivirale Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems	8
1.3	Mitochondrien	9
1.3.1	Morphologie und Funktion von Mitochondrien	9
1.3.2	Mitochondrien als Organellen der antiviralen Immunität	13
1.4	RNA-Interferenz.....	15
1.4.1	Regulation der Genexpression und der genomischen Integrität	15
1.4.2	RNAi als Methode der molekularbiologischen Forschung	16
1.5	Fragestellung.....	17
2	Materialien und Methoden	18
2.1	Geräte.....	18
2.2	Reagenzien und Reagenziensätze.....	19
2.2.1	Allgemeine Reagenzien	19
2.2.2	Reagenzien für molekularbiologische Methoden	19
2.2.3	Reagenzien für biochemische Methoden	20
2.2.4	Reagenzien für zellbiologische Methoden	22
2.2.5	Oligonukleotide	23
2.2.6	Plasmide	24
2.2.7	Zelllinien	25
2.2.8	Viren	26
2.2.9	Software	26
2.3	Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1	DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme	26
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.3.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	27
2.3.4	Klonierung	28
2.3.5	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	29
2.4	Biochemische Methoden.....	31

2.4.1	Zelllyse	31
2.4.2	Co-Immunpräzipitation	31
2.4.3	Subzelluläre Fraktionierung	31
2.4.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).....	32
2.4.5	Western Blot und Immunoblot.....	32
2.4.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
2.5	Zellbiologische Methoden	34
2.5.1	Zellkultur.....	34
2.5.2	Transfektion von Nukleinsäuren.....	34
2.5.3	Virusinfektion von Zellen	35
2.5.4	Bestimmung der Viruslast in Zellkulturüberständen.....	35
2.5.5	Lentivirale RNAi	36
2.5.6	Konfokalmikroskopie lebender Zellen	38
2.5.7	Biolumineszenz-Resonanz Energie-Transfer (BRET).....	39
2.5.8	Bestimmung des Sauerstoff-Verbrauchs und der Laktat-Produktion in lebenden Zellen.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Charakterisierung von CRIF1 als antivirales Protein	41
3.1.1	siRNA-vermittelter knockdown von CRIF1 führt zu verminderter Ausschüttung antiviraler Zytokine nach Virusinfektion und Stimulation mit 5'-ppp-RNA	41
3.1.2	siRNA-vermittelter knockdown von CRIF1 führt zu vermehrter Virusproduktion in infizierten Zellen	42
3.1.3	Überexpression von CRIF1 führt zu vermehrter Ausschüttung von IP-10	42
3.1.4	Stimulation mit 5'-ppp-RNA induziert CRIF1-mRNA	43
3.2	Etablierung eines lentiviralen Systems Doxycyclin-induzierbarer short-hairpin-RNAs.....	44
3.3	Die ursprünglichen Beobachtungen können im Doxycyclin-induzierbaren shRNA-System nicht reproduziert werden	46
3.3.1	Knockdown von CRIF1 mittels shRNA führt nicht zu verminderter Expression von IP-10 oder IFN- β nach Stimulation mit 5'-ppp-RNA, poly(I:C) oder Sendai-Virus.....	46
3.3.2	Knockdown von CRIF1 mittels shRNA führt nicht zu vermehrter, sondern zu verminderter Virusproduktion in infizierten Zellen	48
3.4	CRIF1 ist ein mitochondriales Protein	50
3.4.1	Subzelluläre Fraktionierungen virusinfizierter Zellen	50
3.4.2	Die Lokalisation von CRIF1 wird gesteuert durch eine mitochondriale targeting-Sequenz und ein nukleäres Lokalisationssignal	51
3.5	Eine Interaktion von CRIF1 mit Proteinen des angeborenen Immunsystems konnte nicht gezeigt werden	53
3.5.1	Durch Co-Immunpräzipitation kann keine Interaktion von CRIF1 mit NEMO nachgewiesen werden	53

3.5.2	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von CRIF1 mit STAT3 und NEMO	54
3.6	CRIF1 ist essenziell für die mitochondriale Integrität und die Funktion der Atmungskette	57
3.6.1	Verlust von CRIF1 führt zu veränderter Mitochondrien-Morphologie	57
3.6.2	Verlust von CRIF1 führt zur Umstellung des Zellstoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse	58
3.6.3	Verlust von CRIF1 führt zu verminderter Expression von Komplexen der Atmungskette	59
4	Diskussion	60
4.1	Methodik der CRIF1-Defizienz.....	60
4.1.1	Problematik des CRIF1-Verlustes	61
4.1.2	RNA-Interferenz als experimentelles System	62
4.1.3	Doxycyclin-induzierbare Genregulation	62
4.2	Zelluläre Lokalisation und Interaktionspartner von CRIF1	63
4.2.1	CRIF1 als mitochondriales Protein.....	63
4.2.2	Postulierte Interaktion von CRIF1 mit NEMO und STAT3	65
4.3	CRIF1 als Regulator von Metabolismus, ROS-Homöostase und Zellzyklus.....	66
4.4	CRIF1 als Regulator von Immunantworten.....	68
4.4.1	Interaktionen von Metabolismus und Immunsystem	68
4.4.2	CRIF1 als Bindeglied zwischen Metabolismus und Immunsystem	69
4.4.3	CRIF1-Defizienz als Krankheitsmodell.....	70
4.5	Modell für die Funktion von CRIF1 im angeborenen Immunsystem gegen Virusinfektionen	71
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis	74
7	Abkürzungsverzeichnis	86
8	Abbildungsverzeichnis	89
9	Danksagung.....	90
10	Erklärung.....	91

1 Einleitung

1.1 Die zwei Säulen des humanen Immunsystems

Die Evolution aller höheren Lebewesen war sehr früh bestimmt durch die Auseinandersetzung mit pathogenen Mikroorganismen. Dieser Selektionsdruck führte zu ausgefeilten Abwehrstrategien, um sich gegen Krankheitserreger zur Wehr zu setzen. Dabei stand im Zentrum die Herausforderung, Selbst und Nicht-Selbst zu unterscheiden und Abwehrmechanismen spezifisch gegen Nicht-Selbst zu entwickeln. Parallel dazu verlief die Evolution der Krankheitserreger, die Strategien entwickelten, um sich ihrer Erkennung als Nicht-Selbst zu entziehen. In Wirbeltieren bildeten sich nach aktuellem Verständnis zwei Strategien der Erregerabwehr heraus, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Trotz der separaten Behandlung in den folgenden Abschnitten sind das angeborene und das adaptive Immunsystem funktionell eng verzahnt.

1.1.1 Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist die erste Abwehrlinie des Immunsystems und verantwortlich für die schnelle Erkennung von Krankheitserregern, die Begrenzung ihrer Ausbreitung und die Errichtung einer unspezifischen Abwehrbereitschaft des Organismus. Es ist entwicklungsgeschichtlich sehr alt und besitzt eine Entsprechung in fast allen Lebewesen.

Die Grundlage des angeborenen Immunsystems sind keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte *pathogen recognition receptors* (PRR) wie *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), *RIG-I-like-Rezeptoren* (RLR) oder *NOD-like-Rezeptoren* (NLR). Diese erkennen Krankheitserreger anhand bestimmter Muster, sogenannter *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). PAMPs sind in der Regel nicht spezifisch für einen einzelnen Erreger sondern molekulare Bausteine, die charakteristisch für eine Klasse von Mikroorganismen sind, wie beispielsweise Zellwandbestandteile von Bakterien, Zuckerstrukturen in der Zellwand von Pilzen oder Nukleinsäuren von Viren. Kennzeichnend für PAMPs ist ihre Unentbehrlichkeit für den Erreger. Daher sind sie phylogenetisch hochkonserviert, was erst die Entstehung keimbahnkodierter PRRs möglich machte. Zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems bei Vertebraten gehören Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [1].

In scheinbarem Widerspruch zum Konzept der strikten Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst werden einige PRRs auch durch Moleküle aktiviert, die beim Untergang körpereigener Zellen freigesetzt werden, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMP). Als *hidden self* unterliegen sie unter physiologischen Bedingungen nicht dem Zugriff des Immunsystems, und ihr Auftreten im „falschen“ Kompartiment wird als Ausdruck einer Gefährdung gewertet [2-4]. DAMPs wird eine wichtige Rolle zugeschrieben bei der sterilen Entzündung nach ischämischem oder traumatischem Gewebeuntergang, bei Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen *Lupus erythematoses* oder der rheumatoiden Arthritis, sowie bei kardiovaskulären oder neurodegenerativen Erkrankungen [5, 6]. Eine Übersicht wichtiger PRRs und ihrer Liganden findet sich in Tabelle 1.

Nach Ligandenbindung eines PRR kommt es über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche intrazelluläre Prozesse der Immunabwehr und die Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukinen, Interferonen und Chemokinen regulieren. Zytokine spielen eine zentrale Rolle als Mediatoren des Immunsystems. Sie lösen die Akute-Phase-Reaktion der Leber aus, rekrutieren Entzündungszellen an den Ort der Infektion, regulieren Differenzierung und Proliferation von Immunzellen und vermitteln Vasodilatation. Neben seiner Funktion als erste Abwehrlinie gegen Infektionen ist das angeborene Immunsystem verantwortlich für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch kostimulatorische Signale und antigenpräsentierende Zellen [7, 8].

1.1.2 Antigenpezifität des adaptiven Immunsystems

Das adaptive Immunsystem entwickelte sich erst in den Wirbeltieren und wird repräsentiert durch T- und B-Lymphozyten. Es reagiert auf erstmaligen Antigenkontakt verzögert, dann allerdings hochspezifisch und bildet im Verlauf einer Immunantwort ein immunologisches Gedächtnis aus in Form von langlebigen Gedächtniszellen – die Grundlage jeder Impfung. Anders als die keimbahnkodierte Mustererkennung der angeborenen Immunität basiert das adaptive Immunsystem auf dem Prinzip der erworbenen Antigenpezifität durch somatische Rekombination, Hypermutation und Affinitätsreifung. Dabei entsteht ein schier grenzenloses Repertoire an T- und B-Zell-Rezeptoren, sodass gegen nahezu jedes erdenkliche Antigen eine Population spezifischer Lymphozyten mobilisiert werden kann.

Das adaptive Immunsystem ist abhängig von der Aktivität antigenpräsentierender Zellen der angeborenen Immunität, wie dendritischen Zellen oder Makrophagen. Trifft eine naive T-Zelle auf eine aktivierte antigenpräsentierende Zelle, für deren präsentiertes

Antigen sie spezifisch ist, wird sie durch kostimulatorische Signale zu einer Effektor-T-Zelle aktiviert. T-Zellen, die den *cluster of differentiation 8* (CD8) exprimieren, werden zu zytotoxischen T-Zellen, spezialisiert auf die Abtötung körpereigener Zellen, die mit intrazellulären Erregern infiziert oder maligne entartet sind. CD4-positive T-Zellen haben eine zentrale Bedeutung als T-Helferzellen (Th-Zellen) für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen, sowie als regulatorische T-Zellen für die Kontrolle überschießender Immunreaktionen. Ihre Bedeutung ist anhand der Immunschwächekrankheit *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) erkennbar, bei der selektiv CD4-Zellen durch das humane Immundefizienzvirus (HIV) befallen werden. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und produzieren Immunglobuline [9].

1.2 Das angeborene Immunsystem gegen Virusinfektionen

1.2.1 Viruserkennung durch die Wirtszelle

Die Erkennung von Viren als fremde Erreger ist eine besondere Herausforderung für das angeborene Immunsystem, da Viren durch den zellulären Metabolismus vermehrt werden und somit grundsätzlich aus „Selbst“ bestehen. Während der viralen Replikation entstehen jedoch Nukleinsäuren, die entweder durch ihre Konformation oder durch ihre Lokalisation in besonderen zellulären Kompartimenten als Fremd erkannt werden können.

Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren mit n'-terminalen, extrazellulären *leucine-rich repeats* (LRR)-Sequenzen und einer c'-terminalen, cytoplasmatischen *Toll/IL-1-receptor homology* (TIR)-Domäne. Das humane Genom kodiert für zehn TLRs, die vermehrt in Immunzellen exprimiert werden. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sitzen auf der Zelloberfläche, erkennen dort bakterielle, fungale und parasitäre PAMPs und induzieren nach Aktivierung vor allem proinflammatorische Zytokine. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in Endolysosomen lokalisiert und detektieren eine Vielzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren. Sie führen nach Ligandenbindung insbesondere zur Ausschüttung von Typ-I-Interferonen. TLR3 wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) oder den synthetischen Liganden poly(I:C) aktiviert. Liganden für TLR7 und TLR8 sind einzelsträngige RNA (*single stranded* RNA, ssRNA) oder der synthetische Agonist Resiquimod (R848). TLR9 erkennt DNA mit unmethylierten CpG-Motiven und RNA:DNA-Hybride [10]. Der Ligand von TLR10 ist nicht bekannt.

Nach Ligandenbindung aktivieren TLRs eine Signalkaskade durch Rekrutierung der Adaptermoleküle *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) oder *TIR domain-containing adaptor protein inducing Interferon- β* (TRIF). Die Signalkaskaden führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) und IRF7 und *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). NF- κ B und MAPK regulieren die Expression proinflammatorischer Zytokine wie pro-Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 oder *tumor necrosis factor α* (TNF α), während IRF3 und IRF7 nach Phosphorylierung Typ-I-Interferone induzieren [11].

Retinoid Acid Inducible Gene I-like Rezeptoren (RIG-I-like-Rezeptoren)

Die RIG-I-like-Rezeptoren (RLR) sind eine Familie zytoplasmatischer RNA-Rezeptoren, zu denen RIG-I, *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) gezählt werden. Sie haben eine gemeinsame Architektur aus einer c'-terminalen Domäne (CTD) und einer zentralen DECH-box Helikasen-Domäne. Zusätzlich tragen RIG-I und MDA5 zwei n'-terminale *caspase recruitment domains* (2CARD), die für die Interaktion mit dem Adaptermolekül *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS) verantwortlich sind [12].

RIG-I erkennt einzelsträngige RNA mit einer 5'-terminalen Triphosphat-Gruppe (5'-ppp-RNA) und basengepaarten Strukturen am phosphorylierten 5'-Ende [13, 14]. Diese RNAs kommen typischerweise in Negativstrang-RNA-Viren wie dem Influenza-Virus, vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) oder Masernvirus vor, aber auch in Positivstrang-RNA-Viren wie dem Hepatitis-C-Virus [15]. Bei der Transkription zytoplasmatischer, AT-reicher DNA durch Polymerase III entstehen ebenfalls 5'-ppp-RNAs welche RIG-I aktivieren [16]. Ferner wurde gezeigt, dass auch 5'-Diphosphat-RNA, beispielsweise aus dem Genom von Reoviren, RIG-I aktivieren kann [17].

MDA5 dagegen erkennt typischerweise lange doppelsträngige RNA (dsRNA), wie sie bei der Replikation von Picornaviridae und anderen Positivstrang-RNA-Viren entstehen, beispielsweise bei der Replikation des Poliovirus oder des Encephalomyokarditis-Virus (EMCV) [15].

LGP2 hat eine hohe Affinität für dsRNA, aufgrund fehlender CARD-Domänen kann es jedoch keine Signaltransduktion initiieren. Es wurde in unterschiedlichen experimentellen Modellen sowohl als negativer [18] als auch als positiver Regulator antiviraler Immunität beschrieben [19, 20], wobei neuere Daten eine unterstützende Funktion für die Aktivität von MDA5 nahelegen [21, 22].

MAVS ist aufgebaut aus einer n'-terminalen CARD, einer zentralen *proline-rich region* mit drei *TNF α receptor-associated factor* (TRAF) *binding motifs* sowie einer c'-terminalen Transmembran-Domäne, welche die Lokalisation von MAVS in der äußeren Mitochondrienmembran bestimmt [23-26]. MAVS ist für seine Aktivität auf ein intaktes mitochondriales Membranpotenzial angewiesen [27, 28]. Neben der mitochondrialen wurde auch eine peroxisomale Lokalisation beschrieben, wo MAVS die initiale, Interferon-unabhängige antivirale Genexpression im Frühstadium einer Virusinfektion regulieren soll [29].

Nach Ligandenbindung multimerisieren RIG-I und MDA5 zu Perlenketten-artigen Fibrillen entlang des RNA-Liganden, wobei ihre CARDS Oligomere bilden [30-32]. Diese sind in der Lage, MAVS via dessen CARD zu aktivieren, woraufhin MAVS zu Prionen-ähnlichen Multimeren aggregiert [33]. Über die Rekrutierung anderer Signalmoleküle wie TRAFs, *TANK-binding kinase* (TBK1) und *NF- κ B essential modulator* (NEMO) aktiviert MAVS eine Signalkaskade, die schließlich zur Aktivierung von IRF3, IRF7, NF- κ B und MAPKs führt [11, 34, 35]. Neben ihrer Funktion als Mustererkennungsrezeptoren besitzen RIG-I und MDA5 auch eine direkte Effektorfunktion durch Verdrängung viraler Proteine von doppelsträngiger RNA [36].

Cyclic GMP-AMP-Synthase (cGAS)

Ein wichtiges PAMP im Rahmen von Infektionen mit intrazellulären Erregern ist zytoplasmatische DNA. Doppelsträngige DNA (dsDNA) sowie RNA-DNA-Hybride sind Liganden der zytoplasmatischen *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS), die den *second messenger* 2'-5' cyclisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (cGMP-AMP, cGAMP) produziert. cGAMP ist wiederum Ligand von *stimulator of interferon genes* (STING), einem am endoplasmatischen Retikulum (ER) und an *mitochondria-associated ER membranes* (MAM) lokalisiertem Adapterprotein, welches nach Aktivierung dimerisiert und TBK1, IRF3 und *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6) aktiviert [37-41]. cGAMP-vermittelte antivirale Immunität kann über *gap junctions* und durch Viruspartikel auch auf Nachbarzellen übertragen werden [42-44].

Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-like Rezeptoren (NOD-like-Rezeptoren)

Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR) bilden eine große Familie im Zytosol lokalisierter Mustererkennungsrezeptoren, die durch ein breites Spektrum an PAMPs und DAMPs aktiviert werden können. Sie umfasst sechs NOD-Rezeptoren, 14 *NLR family, pyrin domain containing* (NLRP)-Rezeptoren und zwei *ice*

protease-activating factor (IPAF)-Rezeptoren, von denen NLRPs und IPAFs Inflammasome bilden. Inflammasome sind zytoplasmatische PRRs, die nach Aktivierung oligomerisieren und über die Rekrutierung von Caspase-1 die proteolytische Reifung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 induzieren. Damit spielen sie eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen bei Infektionen, Zelluntergang, Autoimmunkrankheiten und degenerativen Erkrankungen [45].

Am besten charakterisiert ist das NLRP3-Inflammasom, das aus NLRP3, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) und Caspase-1 besteht. NLRP3 wird aktiviert durch eine Vielzahl an Bakterien, Viren und Pilze. Das große Interesse an NLRP3 ist darin begründet, dass es durch zahlreiche endogene Gefahren-Signale aktiviert wird. Dazu gehören ein Abfall des intrazellulären Kaliums [46], extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) aus beschädigten Zellen [47], β -Amyloid-*plaques* [48], sowie Zeichen metabolischer Dysregulation wie erhöhte Plasmaglukose [49], Harnsäurekristalle [50] oder Cholesterin-Kristalle [51]. Außerdem wird NLRP3 aktiviert durch Umweltgifte wie Silikat oder Asbest [52-54].

Zum genauen Mechanismus der NLRP3-Aktivierung gibt es leidenschaftliche Kontroversen. Im Falle kristalliner Strukturen scheint die Freisetzung lysosomaler Bestandteile aus beschädigten Lysosomen eine Rolle zu spielen [48, 54]. Außerdem wird die Aktivierung von NLRP3 durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) postuliert. Tatsächlich induzieren fast alle bekannten NLRP3-Aktivatoren die Produktion von ROS und ROS-Blockade vermindert die NLRP3-Aktivierung [55]. Andererseits führen ROS nicht zwangsläufig zur Aktivierung von NLRP3, sodass ein integratives Modell mit ROS-Produktion in zeitlichem und räumlichem Kontext zu Stimulus und NLRP3 als Mechanismus der Inflammasom-Aktivierung diskutiert wird [55].

Absent in Melanoma 2 (AIM2)

AIM2 gehört zur Familie der *hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats* (HIN-200). AIM2 wird aktiviert durch zytoplasmatische dsDNA und bildet ebenfalls ein Inflammasom mit ASC und Caspase 1 [56-59].

Rezeptor	Lokalisation	Ligand (Ursprung*)	Signalweg
Toll-like-Rezeptoren			
TLR1/2 Dimer	Zelloberfläche	Triacyl-Lipopeptide (B)	MyD88, NF-κB
TLR2/6 Dimer	Zelloberfläche	Diacyl-Lipopeptide (B, V)	MyD88, NF-κB
TLR3	Endolysosom	dsRNA (V), poly(I:C) (synthetisch)	TRIF, IRF3/7 + NF-κB
TLR4	Zelloberfläche	Lipopolysaccharid (B, V), HSPs, Fibrinogen, Histone (S)	MyD88 + TRIF, NF-κB + IRF3/7
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin (B)	MyD88, NF-κB
TLR7, TLR8	Endolysosom	ssRNA (V, B, S), R848 (synthetisch)	MyD88, IRF7 + NF-κB
TLR9	Endolysosom	CpG DNA (V, B), mtDNA (S), Hemozoin (P)	MyD88, IRF7 + NF-κB
RIG-I-like-Rezeptoren			
RIG-I	Zytoplasma	5'-ppp-RNA (V)	MAVS, IRF3/7 + NF-κB
MDA5	Zytoplasma	dsRNA (V)	MAVS, IRF3/7 + NF-κB
LGP2	Zytoplasma	dsRNA (V)	Regulierung von RLRs
NOD-like-Rezeptoren			
NOD1, NOD2	Zytoplasma	Peptidoglykan (B)	RIP2, NF-κB + MAPKs
NLRP1	Zytoplasma	Bacillus anthracis Toxin (B)	Inflammasom, Caspase-1
NLRP3	Zytoplasma	Extrazelluläres ATP, ROS, mtDNA (S) Bakterien, Viren, Pilze Kristalle (Urat, Cholesterin, Silikat, Asbest, Aluminium)	Inflammasom, Caspase-1
NLRC4	Zytoplasma	Flagellin, Typ-III-Sekretionssysteme (B)	Inflammasom, Caspase-1
Andere			
AIM2	Zytoplasma	dsDNA (B, V, S)	Inflammasom, Caspase-1
cGAS	Zytoplasma	dsDNA (B, V, S)	2'-5'-cGAMP, STING, IRF3
OAS	Zytoplasma	dsRNA (B, V, S)	2'-5'-Oligoadenylate, RNase L, RLR, IRF3/7

Tabelle 1: Wichtige Mustererkennungsrezeptoren des Menschen

Übersicht wichtiger PPRs des Menschen samt ihrer Lokalisation, einer Auswahl ihrer Liganden und dem aktivierten Signalweg. Nicht alle PPRs kommen in allen Zellen vor.

* B Bakterien, V Viren, S Selbst, P Protozoen [11, 34, 45, 60, 61]

1.2.2 Antivirale Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems

Das Typ-I-Interferon-System

Eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch virale PAMPs führt über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie, im Besonderen IRF3 und IRF7, zur Induktion von Typ-I Interferonen (IFN), zu denen 14 verschiedene IFN- α und IFN- β gezählt werden. Während die IFN- α -Subtypen überwiegend von Immunzellen, insbesondere plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) ausgeschüttet werden, kann β -Interferon von fast allen Körperzellen produziert werden. Typ-I-Interferone werden abgegrenzt von Typ-II-Interferon, dessen einziger Vertreter IFN- γ insbesondere von T-Zellen und NK-Zellen produziert wird. Typ-I-Interferone sind essentielle Zytokine der antiviralen Immunität und erfüllen im Wesentlichen drei Funktionen: Sie hemmen die Ausbreitung einer Virusinfektion durch Etablierung eines antiviralen Zustands. Sie regulieren angeborene Immunreaktionen durch Stimulation von antigenpräsentierenden Zellen und NK-Zellen sowie durch Hemmung proinflammatorischer Prozesse. Außerdem sind sie essenziell für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort durch Stimulation von CD8-Zellen zur klonalen Expansion und Gedächtnis-Formation, sowie durch Anregung von Antikörperproduktion und Immunklassenwechsel in B-Zellen [62, 63].

Über den IFN- α -Rezeptor (IFNAR) wirken Typ-I-Interferone autokrin auf die sezernierende Zelle und parakrin auf nicht-infizierte Zellen. Ligandenbindung von IFNAR, einem Heterodimer aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, aktiviert die rezeptorassoziierten Proteinkinasen Januskinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (TYK2), die durch Phosphorylierung STAT1 und STAT2 aktivieren. Nach Dimerisierung translozieren diese in den Zellkern, wo sie zusammen mit IRF9 an definierte *IFN-stimulated response elements* (ISRE) im Genom binden und die Expression hunderter Interferon-stimulierter Gene (ISG) regulieren [64-66]. ISGs können den viralen Lebenszyklus auf nahezu allen Ebenen blockieren: *Interferon-inducible transmembrane proteins* (IFITM) und *tripartite motif proteins* (TRIM) hemmen beispielsweise den Viruseintritt in die Zelle und das Virus-uncoating. Die reverse Transkription von Retroviren wird gehemmt durch *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide 3* (APOBEC3). RIG-I und MDA5 sind beteiligt an der Erkennung viraler RNA und IRF1 reguliert die Expression weiterer antiviraler Proteine. 2'-5' Oligoadenylat-Synthasen (OAS) aktivieren nach Erkennung viraler Nukleinsäuren RNase L, welche virale und zelluläre RNAs degradiert und dabei Liganden für RIG-I und MDA5 erzeugt [67-69]. Die Protein-Translation kann durch RNA-aktivierte Proteinkinase (PKR) blockiert werden, und die Assemblierung und Freisetzung

von Viruspartikeln wird gehemmt durch Viperin und Tetherin. Gegen intrazelluläre Bakterien und Protozoen existieren ebenfalls Interferon-induzierbare Abwehrmechanismen. ISGs etablieren in der Zelle also ein antimikrobielles Milieu, das als zellautonome Immunität bezeichnet wird [70].

Neben dem oben beschriebenen, klassischen Signalweg über STAT1/STAT2 Heterodimerisierung können Typ-I-Interferone abhängig von Zelltyp, Erreger und Umweltfaktoren auch alternative Signaltransduktionswege aktivieren, beispielsweise via STAT3, STAT4, STAT5, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), *mammalian target of rapamycin* (mTOR) oder MAPKs. Typ-I-Interferone bilden damit ein komplexes Netzwerk zur Regulation von Immunreaktionen und Zelldifferenzierung [62]. In die Medizin haben Typ-I-Interferone Einzug gefunden als Therapien gegen Multiple Sklerose [71], chronische Hepatitis C [72] und Krebs [73].

Interferon-unabhängige antivirale Effektormechanismen

Ein wichtiger Mechanismus zur Limitierung einer Virusinfektion ist die Auslösung von Apoptose in infizierten Zellen. Unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor kann phosphoryliertes IRF3 über eine Interaktion mit Bax direkt mitochondriale Apoptose induzieren [74]. Aktivierung von RIG-I oder MDA5 führt IRF3- und IFN- β - unabhängig zu mitochondrialer Apoptose durch Induktion von *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) und Noxa [75]. Neben der Apoptose-Induktion wurde beschrieben, dass RIG-I und MDA5 direkt die Virusreplikation hemmen können durch Verdrängung viraler Proteine von dsRNA [36].

1.3 Mitochondrien

1.3.1 Morphologie und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind kleine, von einer Doppelmembran umgebene Organellen mit zentraler Bedeutung für Energiegewinnung, Stoffwechsel, Signaltransduktion und Zelltod. Die innere und die äußere Mitochondrienmembran begrenzen zwei Kompartimente, die Mitochondrienmatrix und den Intermembranraum. Die äußere Mitochondrienmembran ist zusammengesetzt wie andere eukaryotische Membranen und sogenannte Porine machen sie durchlässig für Metabolite und kleine Peptide bis 3 Kilodalton. Die innere Mitochondrienmembran ist auch für kleine Moleküle weitgehend undurchlässig, sodass der Stoffaustausch zwischen Mitochondrienmatrix und Intermembranraum durch

Transportersysteme gewährleistet wird [76]. In Zusammensetzung und biochemischen Eigenschaften ist die innere Mitochondrienmembran prokaryotischen Membranen sehr ähnlich: Ihr Protein/Lipid-Verhältnis ist deutlich erhöht und statt Cholesterin enthält sie Cardiolipin, ein Lipid das sonst nur in prokaryotischen, nicht in eukaryotischen Membranen vorkommt. Die wahrscheinlichste Erklärung für Aufbau und Zusammensetzung von Mitochondrien liefert die Endosymbiontentheorie, wonach Mitochondrien evolutionär aus phagozytierten Bakterien entstanden sind [77].

Die Mitochondrien-Matrix enthält das mitochondriale Genom (mtDNA). Es liegt vor in Form einer zirkulären DNA und kodiert für 13 mitochondriale Proteine sowie zwei ribosomale RNAs (rRNA) und 22 Transfer-RNAs (tRNA). Bei den Proteinen handelt es sich ausschließlich um hydrophobe Untereinheiten von Komplexen der Atmungskette. Mutationen in der mtDNA führen zu schweren neuromuskulären Erkrankungen, in der Regel aufgrund defekter ATP-Synthese [76]. Der überwiegende Teil des mitochondrialen Proteoms ist im Zellkern kodiert und muss nach der Translation vom Zytoplasma in das Mitochondrium transportiert werden. Als Signal für den Mitochondrien-Import dient eine mitochondriale *targeting*-Sequenz (MTS) am n-Terminus des Proteins. Die MTS bildet eine amphiphile Helix, die von Rezeptorproteinen erkannt wird, welche den Mitochondrienimport über die Proteinkomplexe *translocase of the outer membrane* (TOM) und *translocase of the inner membrane* (TIM) steuern. Im Mitochondrium wird die MTS von einer Signalpeptidase entfernt [78].

Mitochondrien sind keine statischen, separaten Organellen, sondern müssen vielmehr als ein plastisches Netzwerk aufgefasst werden, das einer ständigen Dynamik aus Teilung und Verschmelzung, genannt Fission und Fusion, unterliegt. Diese Dynamik erlaubt Mitochondrien den ständigen Austausch von Metaboliten, Proteinen und mtDNA. Die mitochondriale Plastizität ist dabei unabdingbar für den Erhalt der mitochondrialen Integrität und Funktion [76]. Beschädigte mitochondriale Komponenten können von der Zelle isoliert werden und durch eine spezielle Form der Autophagie, genannt Mitophagie, beseitigt werden. Über MAMs pflegen Mitochondrien ferner eine enge Beziehung zum endoplasmatischen Retikulum [79].

Metabolismus

Mitochondrien sind an einer Reihe von Stoffwechselwegen beteiligt. Sie beherbergen den Citratzyklus, die β -Oxidation von Fettsäuren, die Ketonkörper-Biosynthese und den Ketonkörper-Abbau sowie Teile des Harnstoffzyklus und der Häm-Biosynthese. Die bei katabolen Stoffwechselwegen anfallenden Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-

Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) beliefern die Atmungskette mit Elektronen.

Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Die Atmungskette wird gebildet durch große Enzymkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran, die über eine Elektronentransportkette den mitochondrialen Protonengradienten aufbauen. Dieser ist die Voraussetzung für die oxidative Phosphorylierung durch die ATP-Synthase und damit für den Energiehaushalt der Zelle. Die Atmungskettenkomplexe sind große, multimere Enzymkomplexe aus mehreren Untereinheiten. 13 Untereinheiten der Komplexe I, III und IV sind auf dem mitochondrialen Genom, 73 Untereinheiten im Zellkern kodiert. Je ein Komplex I, III und IV lagern sich zu sogenannten Respirasomen zusammen [80].

Elektronen aus katabolen Stoffwechselwegen werden entlang einer elektrochemischen Reihe aufsteigender Redoxpotenziale von NADH über Komplex I, Coenzym Q, Komplex III, Cytochrom C und Komplex IV auf molekularen Sauerstoff (O₂) aus der Atemluft übertragen. Über Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, werden Elektronen von FADH₂ in die Atmungskette eingespeist. Die freiwerdende Energie dieser Redoxreaktionen wird von den Komplexen I, III und IV genutzt, um Protonen (H⁺) von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum zu transportieren. Dieser Protonengradient liefert schließlich der ATP-Synthase – auch als Komplex V bezeichnet – die Energie für die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP [81].

Mitochondrien als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies

Ein geringer Teil der transportierten Elektronen gelangt nicht bis Komplex IV der Atmungskette, wo sie auf O₂ unter Bildung von H₂O übertragen werden, sondern treten direkt dem Membranpotenzial folgend durch Komplex I und III in den Intermembranraum über. Hier können sie unkontrolliert mit O₂ reagieren und bilden dabei ROS wie das Superoxid-Anion O₂^{•-} oder Wasserstoffperoxid H₂O₂ [82, 83].

ROS haben toxische Auswirkungen auf die Zelle durch Oxidation von Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten. Der Akkumulation von ROS und oxidierten Zellkomponenten wird eine wichtige Rolle beim Altern sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes und Krebs zugesprochen, sodass ROS lange als notwendiges Übel der oxidativen Phosphorylierung galten. Erst später wurde erkannt, dass ROS als wichtige Signalmoleküle fungieren, die Prozesse wie Zelldifferenzierung, Wachstum, Metabolismus, Autophagie und das Immunsystem steuern [84-86]. Allgemein wird

angenommen, dass während Stresssituationen vermehrt ROS gebildet werden, die dann als *second messenger* die zelluläre Anpassung auf diesen Stress steuern. Frühe Studien zeigten beispielsweise, dass Mitochondrien unter hypoxischen Bedingungen H_2O_2 produzieren, das den Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) aktiviert, der verantwortlich ist für die metabolische Umstellung zur anaeroben Glykolyse [87, 88].

Der zelluläre Redoxstatus wird durch ein Netzwerk antioxidativer Proteine kontrolliert: Superoxid-Dismutasen beispielsweise reduzieren $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 , welches von Peroxiredoxinen, Gluthation-Peroxidasen und Katalase weiter zu H_2O reduziert wird [88]. Ein wichtiger Regulator antioxidativer Signalwege ist der Transkriptionsfaktor *nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2* (NRF2) [89].

Apoptose

Eine wesentliche Voraussetzung für Gewebedifferenzierung und Gewebekomöostase ist der regulierte Zelltod. Apoptose zeichnet sich aus durch eine kontrollierte Fragmentation subzellulärer Komponenten und endet mit der Abschnürung apoptotischer Zellvesikel, die von phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut werden. Entscheidend ist, dass es dabei – im Gegensatz zu anderen Zelltodformen – zu keiner Freilegung des *hidden self* kommt, Apoptose induziert daher im Allgemeinen keine Immunaktivierung. Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Auslösung von Apoptose, bei der ein intrinsischer von einem extrinsischen Weg unterschieden wird. Alle Wege münden schließlich in der kaskadenartigen, irreversiblen Aktivierung von Effektor-Caspasen, die den Abbau strategischer Zellbestandteile organisieren wie Kernmembran und Chromatin, ER und Golgiapparat, Zytoskelett und Fokaladhäsionen [90].

Zellulärer Stress aktiviert den intrinsischen Weg durch Aktivierung von Proteinen der *B-cell-lymphoma 2* (BCL-2) *homology 3 only* (BH3-only)-Familie, welche die Oligomerisierung von *BCL-2-associated X protein* (BAX) und *BCL-2 antagonist/killer* (BAK) zu Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran induzieren. Diese Kanäle erlauben den Austritt von Cytochrom C aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma, wodurch die Bildung des sogenannten Apoptosoms eingeleitet wird. Das Apoptosom ist ein multimerer Proteinkomplex, der durch Rekrutierung von Caspase-9 die Caspasen-Kaskade aktiviert. Der extrinsische Weg der Apoptose wird ausgelöst durch Aktivierung von *death*-Transmembran-Rezeptoren durch Liganden wie $\text{TNF}\alpha$ oder Fas-Ligand. Über Rekrutierung des Adaptermoleküls *Fas-associated death domain protein* (FADD) wird sowohl direkt die Caspasen-Kaskade ausgelöst, als auch *BH3-interacting domain death agonist* (BID) aktiviert, welches die Bildung von BAX/BAK-Kanälen induziert. Einen dritten Weg der

Apoptoseinduktion stellen die Protease Granzym B und Perforin aus den Vesikeln zytotoxischer T-Zeller oder NK-Zellen dar. Perforin oligomerisiert in der Zellmembran und erlaubt den Eintritt von Granzym B, das ähnlich dem extrinsischen Weg sowohl BID als auch die Caspasen-Kaskade aktivieren kann [90].

1.3.2 Mitochondrien als Organellen der antiviralen Immunität

Mitochondriale Dynamik und Erregerabwehr

Seit der Entdeckung von MAVS als Adapterprotein des RLR-Signalwegs erfahren Mitochondrien große Aufmerksamkeit als zentrale Plattformen der angeborenen Immunität. Ein intaktes mitochondriales Membranpotenzial ist für den MAVS-Signalweg erforderlich [28]. Außerdem wurde beschrieben, dass MAVS durch Mitochondrien-Fragmentation und Reorganisation an Orte viraler Replikation umverteilt wird [91]. Widersprüchliche Daten existieren zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms: NLRP3-Aktivierung wurde sowohl durch mitochondriale Fission [92] als auch durch Elongation beschrieben [93].

Mitochondrialer Stress und Erregerabwehr

Mitochondriale Komponenten können potente DAMPs im Rahmen von Infektionen, Zelltod und Autoimmunerkrankungen darstellen. Beispielsweise aktiviert oxidierte mtDNA, die im Rahmen der Apoptose ins Zytoplasma austreten kann, das NLRP3-Inflammasom [94]. Außerdem wurde gezeigt, dass Cardiolipin während Infektionen oder zellulärem Stress von der inneren zur äußeren Mitochondrienmembran transloziert und dort NLRP3 aktiviert [95]. Freie mtDNA, die reich an unmethylierten CpG-Motiven ist, aktiviert außerdem TLR9, sodass ihr eine Rolle bei rheumatoiden Erkrankungen und beim *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) zugesprochen wird [96, 97]. Ferner wurde beschrieben, dass eine Infektion mit Herpesviren zum Austritt von mtDNA ins Zytoplasma führt, die dort cGAS-abhängig die Expression von Typ-I-Interferonen stimuliert [98].

ROS und Erregerabwehr

Infektionen mit intrazellulären Erregern führen auf nicht genau bekanntem Wege zur Produktion von ROS durch Mitochondrien oder das NADPH-Oxidase (NOX)-System. ROS sind auf zweierlei Weise an Immunreaktionen beteiligt: Sie wirken direkt antimikrobiell und fungieren als Signalmoleküle in der Signaltransduktion.

Das NOX-System in Neutrophilen und Makrophagen produziert große Mengen an ROS für den oxidativen *burst* zur Abtötung phagozytierter Erreger. Zusätzlich induzieren

TLR1, TLR2 und TLR4 – nicht jedoch endosomale TLRs – die mitochondriale ROS-Produktion unter Beteiligung von TRAF6 und *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways* (ECSIT), was zur effizienteren Abtötung intrazellulärer Salmonellen in Makrophagen führt. Catalase-überexprimierende Mäuse, die ein geringeres ROS-Niveau haben, können entsprechend bakterielle Infektionen schlechter bekämpfen [99]. In Patienten mit dem Fiebersyndrom *TNF receptor 1-associated periodic syndrome* (TRAPS) wird das Entzündungsgeschehen durch gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion unterhalten, sodass über die Beteiligung von ROS an weiteren entzündlichen Krankheiten spekuliert wird [100].

Eine wichtige Rolle spielen ROS außerdem in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, wobei die entscheidende ROS-Quelle auch hier Mitochondrien zu sein scheinen [101, 102]. In Makrophagen führt eine Steigerung der mitochondrialen ROS-Produktion durch Behandlung mit OXPHOS-Inhibitoren zu vermehrter NLRP3-Aktivierung, während Antioxidantien die Reaktionen auf NLRP3-Stimuli vermindern. Außerdem wurde gezeigt, dass die Beseitigung dysfunktionaler, ROS-produzierender Mitochondrien mittels Autophagie die Inflammasom-Aktivität hemmt [103, 104]. Nach Stimulation mit Inflammasom-Aktivatoren transloziert NLRP3 unter Beteiligung von MAVS an Mitochondrien und MAMs. Dieser Prozess gewährleistet möglicherweise den Kontakt des Inflammasoms mit kurzlebigen ROS und steuert so dessen Aktivierung [104, 105]. Interessanterweise wurde umgekehrt auch beschrieben, dass aktivierte NLRP3- und AIM2-Inflammasome mittels Caspase-1 die Beschädigung von Mitochondrien induzieren, was zu einer erhöhten ROS-Produktion, einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials und einer Fragmentation des Mitochondriennetzwerks führt [106]. Dies unterstreicht die enge funktionelle Beziehung von Mitochondrien und Inflammasomen.

Auch an der Regulation angeborener Immunreaktionen gegen RNA-Viren sind ROS beteiligt: Autophagie-defiziente Zellen akkumulieren dysfunktionale Mitochondrien und produzieren vermehrt ROS, die zu einer Steigerung der Interferon-Antwort nach RLR-Stimulation führen [107-109]. Außerdem wurde gezeigt, dass ROS aus dem NOX-System während Virusinfektionen für die RLR-Signaltransduktion und IRF3-abhängige Genexpression erforderlich sind und die Expression von MAVS und ISGs steigern [110]. COX5B, eine Untereinheit der Cytochrom C-Oxidase, hemmt die antivirale Signaltransduktion sowohl über eine direkte Interaktion mit MAVS, als auch durch Hemmung der mitochondrialen ROS-Produktion [111]. Zur Funktion von NLRX1, einem mitochondrial lokalisierten NLR, der die mitochondriale ROS-Produktion steigert und mit MAVS interagiert, gibt es widersprüchliche Daten [112-116].

1.4 RNA-Interferenz

1.4.1 Regulation der Genexpression und der genomischen Integrität

Kurze, doppelsträngige RNAs regulieren in Eukaryoten sequenzspezifisch die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene. Dieser Mechanismus wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet [117]. Je nach Ursprung der regulatorischen RNA werden *micro-RNA* (miRNA) und *short interfering RNA* (siRNA) unterschieden [118].

miRNAs sind konservierte regulatorische RNAs, die in Introns des Genoms kodiert sind und Wachstum, Differenzierung und Metabolismus kontrollieren [119, 120]. RNAi-Dysfunktion ist daher assoziiert mit kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen sowie Krebs [121]. miRNAs entstehen aus über 1000 Basenpaaren großen Primärtranskripten (pri-miRNA) mit komplexen Haarnadelstrukturen und langen doppelsträngigen Bereichen, die durch die RNase *Drosha* als Bestandteil des *Microprocessor*-Komplexes schrittweise zu miRNAs prozessiert werden [122, 123]. Schätzungsweise mehr als 60 % aller menschlichen Gene werden durch über tausend verschiedene miRNAs reguliert [124, 125].

siRNAs haben die Funktion, die Integrität des Genoms zu schützen und Virusinfektionen abzuwehren. Sie entstehen durch Prozessierung langer doppelsträngiger RNAs, die beispielsweise bei der Transkription von Transposons oder während der Replikation von Viren entstehen. Sie unterdrücken daher in der Regel das Gen, von dem sie abgeleitet wurden [118, 126-130]. Bisher sind siRNAs primär in Pflanzen und Wirbellosen beschrieben, eine physiologische Rolle von antiviralen siRNAs in Säugetieren wird dagegen kontrovers diskutiert [129-134]. Auch eine neuere These, nach der die antivirale RNAi in Wirbeltieren durch Interferon-induzierbare Proteine aktiv unterdrückt, nach Ausschalten des Interferon-Systems jedoch wieder sichtbar wird, ist umstritten [131, 135-138].

Die Endstrecke der RNAi-Signalwege ist in Säugetieren nahezu identisch: miRNAs und siRNAs werden aus ihren Vorläuferstufen durch die Nuklease *Dicer*, einem Mitglied der Ribonuklease III-Familie, in ihre endgültige Form eines doppelsträngigen RNA-Oligonukleotids von 20-25 Basenpaaren Länge mit einem Dinukleotid-Überhang am 3'-Terminus und einem 5'-Monophosphat prozessiert [139-141]. siRNAs oder miRNAs werden im Zytoplasma in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) aufgenommen, der die Doppelstränge trennt und einen der Stränge – definiert als Passagierstrang – abbaut. Der verbleibende Strang wird auf ein Argonautprotein geladen; er wird als Leitstrang bezeichnet und definiert die Spezifität der regulatorischen RNA zu einer Ziel-RNA. siRNAs sind in

der Regel von ihrem eigenen Locus abgeleitet und daher perfekt komplementär zu ihrer Ziel-RNA. Die Komplementarität von miRNAs beschränkt sich dagegen auf wenige Nukleotide in der 3'-untranslatierten Region (UTR) der mRNA, sodass eine einzige miRNA mehrere mRNAs regulieren kann [124, 142, 143]. Nach Basenpaarung des Leitstrangs mit der Ziel-mRNA katalysiert das Argonautprotein je nach biologischem Kontext deren Abbau, eine alleinige Translationshemmung oder eine Deadenylierung der mRNA mit konsekutiver Degradation [144].

1.4.2 RNAi als Methode der molekularbiologischen Forschung

Genregulation durch RNAi ist ein effizientes Werkzeug, um die Funktion von Genen zu untersuchen. Die Unterdrückung der Genexpression durch RNAi wird als *knockdown* bezeichnet [117, 145-147]. Grundsätzlich existieren zwei Methoden der RNAi: Die Transfektion synthetischer siRNA oder die intrazelluläre Expression von siRNA durch spezielle Vektoren. Erstgenannte Methode ist das schnellere und einfachere Verfahren und für Screenings gut geeignet; Nachteil ist der transiente Charakter des *knockdowns*. Dies kann umgangen werden durch Verwendung von Vektoren, die für siRNAs kodieren und intrazellulär exprimiert werden. Auf dem Vektor wird eine *short hairpin* RNA (shRNA) kodiert, die sowohl Passagier- als auch Leitstrang einer siRNA enthält, getrennt durch eine Linker-Sequenz. Diese RNA bildet eine Haarnadelstruktur, die von *Dicer* durch Herausschneiden der Linker-Sequenz zu einer doppelsträngigen siRNA prozessiert wird [148]. Ferner wurden lentivirale Expressionssysteme entwickelt, die eine stabile genomische Integration des Vektors ermöglichen [149, 150]. Die Klonierung von siRNA-Konstrukten unter der Kontrolle medikamenten-induzierbarer Promotoren erlaubte schließlich konditionale *knockdowns* von Genen, die wichtig für Zellüberleben, Zellzyklusregulation und Differenzierung sind [151-155].

1.5 Fragestellung

Eine Virusinfektion induziert ein hochkomplexes Abwehrprogramm, welches die Regulation der Expression hunderter Gene und die Aktivierung zahlreicher Signalwege umfasst. Um den Signalweg der RLRs genauer zu charakterisieren, wurden in unserer Arbeitsgruppe *human embryonic kidney* (HEK) 293-Zellen mit VSV infiziert und aus den Lysaten Co-Immunpräzipitations-Experimente mit RIG-I durchgeführt. Mittels Massenspektrometrie wurde dabei das Protein *cytokine-responsive 6-interacting factor 1* (CRIF1) als potenzieller Interaktionspartner von RIG-I identifiziert (Dominik Höchter, Daten nicht gezeigt).

CRIF1 wurde zuerst beschrieben als nukleäres Protein, welches mit dem L2-Capsid-Protein des humanen Papillomavirus (HPV) Typ 11 und 16 interagiert und *Papillomavirus L2 interacting nuclear protein* (PLINP) benannt [156]. Ferner wurde CRIF1 als nukleär lokalisierter Tumorsuppressor charakterisiert, der als Cofaktor von *growth arrest and DNA damage-inducible 45* (GADD45)-Proteinen – daher die alternative Bezeichnung als *GADD45 γ interacting protein 1* (GADD45GIP1) – sowie als Inhibitor von Nur77 und *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2) den G1/S-Übergang des Zellzyklus hemmt [157-159]. CRIF1 wurde zudem charakterisiert als essentieller Koaktivator des onkogenen und pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors STAT3 [160].

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe zeigten daraufhin, dass die Depletion von CRIF1 mittels siRNA in Zelllinien tatsächlich zu einer deutlichen Beeinflussung von Infektionsraten und Virustitern sowie einer veränderten Ausschüttung antiviraler Zytokine führten, jedoch ließ sich die Interaktion zwischen CRIF1 und RIG-I nicht bestätigen (Stefanie Lietke, Daten nicht gezeigt). Wir postulierten daher für CRIF1 einen RIG-I-unabhängigen Einfluss auf die antivirale Immunität.

Im Rahmen dieser Promotion sollte der Einfluss von CRIF1 auf das antivirale Immunsystem untersucht werden. Im Zentrum der Arbeit stand die genauere funktionelle Charakterisierung von CRIF1 als antivirales Protein sowie eine mechanistische Erklärung für die Rolle von CRIF1 in der antiviralen Immunität. Im Speziellen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Können die in Experimenten mit siRNAs beobachteten antiviralen Effekte von CRIF1 in einem anderen experimentellen System reproduziert werden? Welche Lokalisation hat CRIF1 in der Zelle und wie wird diese Lokalisation vermittelt? Lassen sich Interaktionen von CRIF1 mit anderen Komponenten des angeborenen Immunsystems nachweisen? Hat ein Fehlen von CRIF1 phänotypische Auswirkungen auf die Zelle?

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

<i>Alpha Imager</i> HP	Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, DE)
<i>Freedom Evo</i> 200 Workstation	Tecan (Männedorf, DE)
<i>Imagequant</i> LAS	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Inkubator	Heraeus (Hanau, DE)
<i>Inolab</i> pH-Messgerät 720	WTW (Darmstadt, DE)
<i>Laminair</i> HB 2448 Sterilbank	Heraeus (Hanau, DE)
Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Lichtmikroskop	Zeiss (Jena, DE)
<i>LightCycler</i> 480	Roche (Basel, CH)
<i>LUMIstar</i> OPTIMA	BMG (Ortenberg, DE)
MCF-2360 Minizentrifuge	LMS (Tokyo, JP)
<i>Mr. Frosty freezing container</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>Multifuge</i> 3L-R Zentrifuge	Heraeus (Hanau, DE)
<i>Multiplate Reader</i> Mithras LB 940	Berthold Technologies (Bad Wildbach, DE)
NanoPhotometer	Implen (München, DE)
<i>Nucleofector</i> 2, 96-Well	Lonza (Köln, DE)
<i>Power Pac</i> 200 Stromquelle	Bio-Rad (München, DE)
<i>Thermocycler</i> T3	Biometra (Göttingen, DE)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf (Hamburg, DE)
<i>Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Bio-Rad (München, DE)
UV-Transilluminator	LKB Biotech (Warschau, PL)
<i>Vortex</i> Mixer	Janke & Kunkel (Staufen, DE)
Waage LP 6209	Sartorius (Göttingen, DE)
Waage SBC 21	Scaltec Instruments (Heiligenstadt, DE)
Wasserfilter	Millipore (Schwalbach, DE)
XFe96 <i>Analyzer</i>	Seahorse Bioscience (North Billerica, USA)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, DE)

2.2 Reagenzien und Reagenziensätze

2.2.1 Allgemeine Reagenzien

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Roth (Karlsruhe, DE)
Chlorwasserstoff HCl	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe, DE)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe, DE)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, DE)
Magnesiumchlorid MgCl ₂	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Merck (Darmstadt, DE)
Natriumchlorid NaCl	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumhydroxid NaOH	Roth (Karlsruhe, DE)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	PAA (Linz, A)
Polysorbat 20 (Tween 20)	Roth (Karlsruhe, DE)
TRIS-Acetat	Roth (Karlsruhe, DE)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth (Karlsruhe, DE)
TRIS/Hydrogenchlorid (TRIS/HCl)	Roth (Karlsruhe, DE)

2.2.2 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Desoxyribonukleotide (dNTP)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>PfuUltra</i> DNA Polymerase und Puffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

<i>LightCycler 480 Probes Master</i>	Roche (Basel, CH)
<i>PeqGOLD total RNA Kkit</i>	PEQLAB (Erlangen, DE)
<i>RevertAid H Minus</i> Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>RiboLock</i> RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>Universal Probe Library</i>	Roche (Basel, CH)

Agarosegel-Elektrophorese

6x <i>Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>GeneRuler DNA ladder mix</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

JETQuick PCR Purification Spin Kit,
JETQuick Gel Extraction Spin Kit

Genomed (Löhne, DE)

Klonierung

Ampicillin	Roth (Karlsruhe, DE)
DH5 α Bakterien	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Gateway BP Clonase Enzym-Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gateway LR Clonase Enzym-Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
LB Agarose	Roth (Karlsruhe, DE)
Luria Bertani (LB) Medium	Roth (Karlsruhe, DE)
NucleoBond Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

2.2.3 Reagenzien für biochemische Methoden

Zelllyse

β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Glycerol	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumfluorid NaF	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumorthovanadat Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Nonidet P-40 (NP40)	Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Proteaseninhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Tetra-Natriumdiphosphat Na ₄ P ₂ O ₇	Roth (Karlsruhe, DE)

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Glycin	Roth (Karlsruhe, DE)
Immobilon-P Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfermembran 0,2 μ m	Millipore (Schwalbach, DE)
Lämmli Probenpuffer	Bio-Rad (München, DE)
Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Roth (Karlsruhe, DE)
Rotiporese Gel 30 (37,5:1)	Roth (Karlsruhe, DE)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, DE)

Western Blot

Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe, DE)
DC Protein Assay	Bio-Rad (München, DE)
ECL-Plus <i>Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Löschpapier	Schleicher & Schuell (Düsseldorf, DE)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumazid (NaN ₃)	Roth (Karlsruhe, DE)
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Western Blot Substrat A / B	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

Immunpräzipitation

anti-c-Myc Agarose <i>Affinity Gel</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
anti-Flag M2 <i>Affinity Gel</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA Substratlösung	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
Humaner IP-10 ELISA Kit	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
Schwefelsäure H ₂ SO ₄	Roth (Karlsruhe, DE)

Antikörper

anti-β-Aktin mAb, HRP-gekoppelt; sc-47778 (m)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-cMyc mAb; 9E10 (m)	Gentaur (Kampenhout, BE)
anti-COXIV pAb; ab16056 (rb)	Abcam (Cambridge, UK)
anti-CRIF1 mAb (M-222); sc-13-4882 (rb)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-Cytochrom C pAb; #4272 (rb)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-Flag mAb (m)	Gentaur (Kampenhout, BE)
anti-HSP60 pAb (H-300); sc-13966 (rb)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-mouse-IgG, HRP-gekoppelt	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-rabbit-IgG, HRP-gekoppelt	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-TOM40 pAb (H-300); sc-11414 (rb)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Total OXPHOS <i>Rodent WB Antibody Cocktail</i> ; ab110413 (m)	Abcam (Cambridge, UK)

2.2.4 Reagenzien für zellbiologische Methoden

Zellkultur

<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun (Melsungen, D)
Ciprofloxacin	Stada (Bad Homburg, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, DE)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA (Linz, A)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL (Paisley, GB)
<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i> (GMEM)	Gibco BRL (Paisley, GB)
L-Glutamin	PAA (Linz, A)
OptiMEM	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i> (RPMI-1640)	PAA (Linz, A)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>Tryptose Phosphate Broth</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Allgemeine Verbrauchsmittel und Plastikwaren für Zellkultur wurden von Becton Dickinson (Le Pont de Claix, FR), Bibby Sterilin (Newport, GB), Corning (Corning, USA), Falcon (Heidelberg, DE) und Greiner (Frickenhausen, DE) bezogen.

Transfektion, Elektroporation

96-Küvetten-Nukleofektionsplatten	Lonza (Köln, DE)
<i>Cell Line Nucleofector Kit</i>	Lonza (Köln, DE)
<i>Lipofectamine 2000</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>Lipofectamine RNAiMAX</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>Novagen GeneJuice</i>	EMD Chemicals (San Diego, CA, USA)
<i>Nucleofector 2</i>	Lonza (Köln, DE)

PRR-Agonisten und Zytokine

<i>MEGAscript T7 Transcription Kit</i> zur <i>in-vitro</i> -Transkription von 5'-ppp-RNA	Ambion (Kassel, DE)
Poly(I:C)	Invivogen (San Diego, USA)
Rekombinantes IFN- α	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Plaque Assay

LE Agarose	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, DE)
Kristallviolett	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Konfokalmikroskopie

<i>CELLview glass bottom dishes</i>	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Hoechst-33342	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>MitoTracker Red CMXRos</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.2.5 Oligonukleotide

siRNA

siRNA	Sequenz 5' → 3'	Ref.
siCRIF1_1	GCAGAGUGCAUGGCCAAGA	
siCRIF1_2	CCACAGAUGAUUGUGAACU	
siRIG-I	AUCACGGAUUAGCGACAAA	[14]
Co4	GCGCUAUCCAGCUUACGUA	[14]

siRNA gegen CRIF1 wurde mit dem online *siDESIGN Center* (GE Dharmacon) entworfen und von Eurofins MWG (Ebersberg, DE) bezogen.

shRNA

shRNA	cDNA-Sequenz 5' → 3'	TRC / Clone
shCRIF1_196	ccgg-GCTAAGCAGTTCGCGCGTTAC-ctcgag-GTAACGCGCGAACTGCTTAGC-tttttg	TRCN0000241878 / NM_052850.2-196s21c1
shCRIF1_405	ccgg-GATGCCACAGATGATTGTGAA-ctcgag-TTCACAATCATCTGTGGCATC-tttttg	TRCN0000241882 / NM_05285 0.2-405s21c1
shCo	cccc-CAACAAGATGAAGAGCACCAA-ttcaagaga-TTGGTGCTCTTCATCTTGTTG-tttttgaaa	[161]

Die Sequenzen von shCRIF1_196 und shCRIF1_405 sind validierte shRNA-Sequenzen des *RNAi Consortium* am Broad Institute (Boston, MA, USA).

PCR-Primer

Primer		Sequenz 5' → 3'
huCRIF1	<i>for</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctacacc-ATGGCGGCGTCCGTGCGACAG
	<i>rev</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggta-GGAGCTGGGTGCCCCAGAGG
huCRIF1Δ	<i>for</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctacacc-ATGGGACCCCGGTGGCCAG
	<i>rev</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggta-GGAGCTGGGTGCCCCAGAGG
huCRIF1Δ*	<i>rev</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggta-TCAGGAGCTGGGTGCCCCAGAGG
huNEMO	<i>for</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctacacc-ATGAATAGGCACCTCTGGAAG
	<i>rev</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggta-CTCAATGCACTCCATGACATG

Alle PCR-Primer wurden bezogen von Metabion (Planegg, DE).

* alternativer *reverse*-Primer mit Stop-Codon zur Klonierung von CRIF1Δ in den BRET-Vektor mit n'-terminaler MTS. Als *forward*-Primer wurde huCRIF1Δ *forward* verwendet.

cDNA-Umschrieb

Primer	Sequenz 5' → 3'
Oligo(dT)18	TTTTTTTTTTTTTTTTTT

Der Primer wurde bezogen von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

qRT-PCR-Primer

Primer		Sequenz 5' → 3'	Universal Probe Library Sonde #
huHPRT	for	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	73
	rev	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	
huCRIF1	for	CTGGCCGAAGAGCAGAAG	32
	rev	TCTTGGCCATGCACTCTG	
huRIG-I	for	TGGACCCTACCTACATCCTGA	69
	rev	GGCCCTTGTTGTTTTTCTCA	
VSV-N	for	CGAAGACAAACAAACCATTATTATCA	85
	rev	TCTGCAACTTCTCGGTTCAA	

Alle qRT-PCR Primer wurden im online Roche *ProbeFinder Assay Design Center* entworfen und von Metabion bezogen (Planegg, DE).

2.2.6 Plasmide

Plasmid	Vektor	Insert	Tag
pmCherry	pcDNA5-FRT/TO-FA-mCherry	–	c'-mCherry
pMyc-CRIF1	pCS2-MYC-FA	huCRIF1	n'-Myc
pCRIF1-mCherry	pcDNA5-FRT/TO-FA-mCherry	huCRIF1	c'-mCherry
pCRIF1	pcDNA5-FRT/TO-FA	huCRIF1	–
pFlag-NEMO	pCAGGS	huNEMO	n'-Flag
pSPAX2	pSPAX2	–	–
pVSV-G	pcDNA3.1(–)	VSV-G	–
pshCo	pLKO2mod-EGFP-WPRE	shCo	–
pshCRIF1_196	pLKO2mod-EGFP-WPRE	shCRIF1_196	–
pshCRIF1_405	pLKO2mod-EGFP-WPRE	shCRIF1_405	–
pLKO2tetO2mod-shCo	pLKO2tetO2mod-EGFP-T2A-tetR-WPRE	shCo	–
pLKO2tetO2mod-shCRIF1_196	pLKO2tetO2mod-EGFP-T2A-tetR-WPRE	shCRIF1_196	–
pLKO2tetO2mod-shCRIF1_405	pLKO2tetO2mod-EGFP-T2A-tetR-WPRE	shCRIF1_405	–
pRluc-CRIF1	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1	n'-Rluc
pCRIF1-Rluc	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1	c'-Rluc
pVenus-CRIF1	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1	n'-Venus
pCRIF1-Venus	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1	c'-Venus
pRluc-CRIF1Δ	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1ΔMTS	n'-Rluc
pCRIF1Δ-Rluc	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1ΔMTS	c'-Rluc
pVenus-CRIF1Δ	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1ΔMTS	n'-Venus
pCRIF1Δ-Venus	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1ΔMTS	c'-Venus

pMTS-Venus-CRIF1Δ	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1ΔMTS	n'-MTS-Venus
pMTS-Rluc-CRIF1Δ	pDONR221 / pENTR221	huCRIF1ΔMTS	n'-MTS-Rluc
pRluc-NEMO	pDONR221 / pENTR221	huNEMO	n'-Rluc
pNEMO-Rluc	pDONR221 / pENTR221	huNEMO	c'-Rluc
pVenus-NEMO	pDONR221 / pENTR221	huNEMO	n'-Venus
pNEMO-Venus	pDONR221 / pENTR221	huNEMO	c'-Venus
pRluc-STAT3	pDONR221 / pENTR221	huSTAT3	n'-Rluc
pSTAT3-Rluc	pDONR221 / pENTR221	huSTAT3	c'-Rluc
pVenus-STAT3	pDONR221 / pENTR221	huSTAT3	n'-Venus
pSTAT3-Venus	pDONR221 / pENTR221	huSTAT3	c'-Venus

pFlag-NEMO wurde zur Verfügung gestellt von Karl-Klaus Conzelmann, Genzentrum der LMU.

pSPAX2 stammt von Didier Trono, *Ecole polytechnique fédérale de Lausanne* (CH).

pVSV-G, pshCo und pLKO2tetO2mod-shCo wurden zur Verfügung gestellt von Peer-Hendrik Kuhn, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), München.

pRluc-STAT3, pSTAT3-Rluc, pVenus-STAT3, pSTAT3-Venus sowie pDONR221 und pENTR221 zur Erstellung der BRET-Plasmide wurden zur Verfügung gestellt von Søren Gersting, Dr. von Haunersches Kinderspital, Klinikum der Universität München.

2.2.7 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
1205lu	humane Melanom-Zelllinie
BHK-21	<i>baby hamster kidney fibroblasts</i>
CRIF1 f/f MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> mit geflochten CRIF1-Loci
HEK 293	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEK 293T	<i>human embryonic kidney cells</i> mit Überexpression des <i>Simian Virus 40 large T antigen</i>
OCI	humane akute myeloische Leukämie-Zelllinie
THP-1	humane akute Monozytenleukämie-Zelllinie

OCI-Zellen wurden zur Verfügung gestellt von Felix Lichtenegger, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München.

CRIF1 f/f MEF wurden zur Verfügung gestellt von Minho Shong, *Chungnam National University* (Daejeon, KR) [162]. Die Zellen wurden von Simon Hirschberger, Klinikum der Universität München, mit einem stabilen Doxycyclin-induzierbaren Cre-Rekombinase-Konstrukt modifiziert und zur Verfügung gestellt.

Die restlichen Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

2.2.8 Viren

Virus	Beschreibung
VSV wt	Vesikuläres Stomatitis Virus Indiana-Stamm mit Expression von <i>green fluorescent protein</i> (GFP)
VSV M51R	Vesikuläres Stomatitis Virus Indiana-Stamm mit Met→Arg-Substitution an Position 51 des M-Proteins und GFP-Expression
SeV	Sendai-Virus Cantell-Stamm

VSV wt und VSV M51R wurden zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München [163, 164].

SeV wurde bezogen von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA).

2.2.9 Software

<i>Adobe Creative Suite</i>	Adobe Systems (San José, CA, USA)
<i>CLC Main Workbench 7</i>	CLC bio (Aarhus, DK)
<i>LightCycler 480 Software</i>	Roche (Basel, CH)
<i>Microsoft Office 2011</i>	Microsoft (Redmond, WA, USA)
<i>Graph Pad Prism</i>	Graph Pad Software Inc. (San Diego, CA, USA)

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind aus Prokaryoten isolierte Endonukleasen, welche dsDNA an spezifischen Nukleotid-Sequenzen schneiden. Sie können überhängende oder glatte Enden erzeugen und werden angewendet bei der Klonierung, zur Modifikation von DNA und für analytische Zwecke. Für einen Restriktionsverdau wurden 0,2 – 2 µg DNA mit je 1 U eines oder mehrerer Restriktionsenzyme im entsprechenden Puffer des Herstellers angesetzt und eine Stunde bei 37° C inkubiert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation eines doppelsträngigen DNA-Abschnittes *in vitro*. Das PCR-Produkt ist definiert durch zwei Primer, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide von 15-30 Basenpaaren Länge, die die 5'-Enden der komplementären Einzelstränge repräsentieren. Während eines PCR-Zyklus werden durch Erhitzung die Doppelstränge der DNA denaturiert, nach Abkühlung hybridisieren


die Primer mit der DNA und werden durch eine thermostabile DNA-Polymerase zu einem komplementären Einzelstrang verlängert. Da die neu synthetisierte DNA in den Folgezyklen als Matrize dient, verdoppelt sich unter optimalen Bedingungen die Menge des PCR-Produkts mit jedem PCR-Zyklus.

Standard-PCR Ansatz

100 – 500 pg DNA	Volumen variabel
10x <i>PfuUltra II Reaction Buffer</i>	5 μ l
10 mM dNTP Mix	5 μ l
10 μ M <i>forward</i> Primer	5 μ l
10 μ M <i>reverse</i> Primer	5 μ l
<i>PfuUltra</i> DNA Polymerase	1 μ l
Nuklease-freies H ₂ O	ad 50 μ l Gesamtvolumen

Standard-PCR-Zyklus

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale DNA-Denaturierung	5 Min.	95° C
DNA-Denaturierung	20 Sek.	95° C
Primer-Hybridisierung	20 Sek.	72° C *
Primer-Elongation	15 Sek. **	72° C
Finale Elongation	10 Min.	72° C
Zyklus-Ende	∞	4° C

 25 – 35 Zyklen

* Schmelztemperatur der Primer – 5° C

** 2 Min./kb PCR-Produkt

2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Mittels Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern dabei durch das Agarosegel von der Kathode Richtung Anode. 50 μ l DNA wurden mit 10 μ l 6 x *loading dye* (Thermo Fisher Scientific) vermischt, auf ein- bis zweiprozentige Agarosegele aufgetragen und in TAE-Puffer bei 90 Volt 30-45 Minuten aufgetrennt. Als Größenmarker wurde eine 1 kb DNA-Leiter aufgetragen (*GeneRuler DNA ladder mix*, Thermo Fisher Scientific). Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden analysiert und mittels *Alpha-Imager* (Alpha Innotech) dokumentiert oder die gewünschten Banden zur weiteren Verwendung aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurden der *JETQuick PCR Purification Spin Kit* oder der *JETQuick Gel Extraction Spin Kit* (Genomed) gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

Zusammensetzung der Puffer und Gele

TAE Puffer	40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA
Agarosegel (1 / 2 %)	2 / 4 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid, 200 ml TAE-Puffer

2.3.4 Klonierung

Die Technik der Klonierung umfasst eine Reihe von Methoden, um eine DNA-Sequenz in einen Vektor zu integrieren. Als Vektor dienen häufig Plasmide, die in Bakterien repliziert werden und die Expression eines Transgens in anderen Organismen steuern. Plasmide benötigen daher einen bakteriellen *origin of replication* (ORI), ein bakterielles Resistenzgen zur Antibiotika-Selektion und Restriktions-Schnittstellen, an denen die zu klonierende DNA-Sequenz eingefügt werden kann. Klassischerweise wird diese DNA-Sequenz in ihren flankierenden Regionen und das Ziel-Plasmid mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, sodass jeweils komplementäre, überhängende Enden entstehen. Durch eine Ligationsreaktion wird das Transgen in den Vektor integriert.

Gateway-Klonierung

Zur Klonierung der BRET-Plasmide wurde das *Gateway*-System (Invitrogen) verwendet, das auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ basiert. Es erlaubt die Integration des Phagen-Genoms über seine Rekombinationsstellen *attP* in das Chromosom von *E. coli* an dessen Rekombinationsstellen *attB*. Die Integration wird katalysiert von zwei Enzymen, Integrase (Int) des Phagen λ und *integration host factor* (IHF) von *E. coli*. Die Rekombination zwischen den *attB*- und *attP*-Stellen (BP-Reaktion) erzeugt *attL*- und *attR*-Sequenzen, die das integrierte DNA-Fragment flankieren. Diese Reaktion ist reversibel, wobei die Exzision zusätzlich zu Int und IHF durch das Protein Xis katalysiert wird. Bei der Exzision entstehen durch Rekombination der *attL*- und *attR*-Sequenzen wieder *attB*- und *attP*-Sequenzen (LR-Reaktion). Das *Gateway*-System erlaubt den einfachen Austausch von DNA-Sequenzen zwischen einem gemeinsamen Ausgangs-Vektor, genannt *entry clone*, und einer Vielzahl unterschiedlicher Expressionsvektoren.

Um *entry clones* von CRIF1, CRIF1 Δ und NEMO herzustellen, wurden diese via PCR mit Primern, die an den Enden die *attB*-Sequenzen enthalten, mit *attB*-Sequenzen versehen. 50 fmol des PCR-Produkts wurden mit 150 ng des Donor-Vektors pDONR221 und 2 µl BP-Clonase vermischt und 2 Stunden bei 25° C inkubiert. Durch Hinzufügen von 1 µl Proteinase K und 10-minütiger Inkubation bei 37° C wurde die Reaktion gestoppt. Chemisch kompetente DH5 α -Bakterien wurden mit dem Reaktionsansatz

transformiert, einzelne Klone unter Kanamycin-Selektion isoliert und expandiert, die Plasmid-DNA isoliert und die korrekte Integration mittels Sequenzierung bestätigt.

Für die Herstellung der Expressionsvektoren wurden 100 ng *entry clone* mit 150 ng des Zielvektors pENTR221 und 2 μ l LR-Clonase vermischt und 2 Stunden bei 25° C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch 1 μ l Proteinase K und 10-minütige Inkubation bei 37° C und der Reaktionsansatz in chemisch kompetente DH5 α -Bakterien transformiert. Unter Ampicillin-Selektion wurden einzelne Klone isoliert und expandiert, die Plasmid-DNA extrahiert und die korrekte Rekombination durch Restriktionsenzym-Verdau bestätigt.

Amplifizierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Chemisch kompetente DH5 α -Bakterien wurden aufgetaut, vorsichtig mit Plasmid-DNA vermischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert, für eine Minute einem Hitzeschock von 42° C ausgesetzt und wieder auf Eis gestellt. Dann wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37° C in 200 μ l LB-Medium inkubiert, auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum als Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Eine der Kolonien wurde unter Antibiotika-Selektion in 200 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C expandiert und die Plasmid-DNA mit dem *NucleoBond Xtra Midi Plus Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.3.5 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Mittels quantitativer Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) kann das Expressions-Niveau von Genen relativ zu einem Referenzgen anhand der Menge spezifischer mRNA untersucht werden. Hierzu wird mRNA zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase und mittels eines Oligo(dT)₁₈ Primers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In einer qRT-PCR mit dem *Universal Probe-System* (Roche) kommt neben zwei spezifischen Primern für das zu quantifizierende Gen eine DNA-Sonde zum Einsatz, die komplementär zu einem Bereich des PCR-Produkts ist. Die Sonde ist am 5'-Terminus mit einem Fluorophor markiert, dessen Fluoreszenz durch einen Quencher-Farbstoff am 3'-Terminus der Sonde unterdrückt wird. Während der Elongation werden Quencher und Fluorophor durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase räumlich getrennt und das Fluorophor kann nach Anregung ein Fluoreszenzsignal abgeben. Der exponentielle Anstieg dieses Fluoreszenzsignals im Verlauf der PCR verhält sich proportional zur Menge des PCR-Produkts und korreliert mit der Ausgangsmenge der zu

quantifizierenden cDNA in der Probe. Diese wurde relativ zu dem Haushaltsgen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) berechnet.

Total-RNA wurde aus $10^5 - 10^7$ Zellen mit dem *PeqGOLD total RNA Kit* (PEQLAB) nach Protokoll des Herstellers extrahiert.

Standard-Ansatz cDNA-Umschrieb

50 ng – 1 µg RNA	Volumen variabel
100 µM Oligo(dT) ₁₈ Primer	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
<i>RiboLock</i> RNase-Inhibitor	0,5 µl
<i>RevertAid</i> H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
5 x Reverse Transkriptase-Puffer	4 µl
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 42° C im Thermoblock inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 70° C wurde die Reaktion gestoppt.

Standard-Ansatz qRT-PCR

cDNA	1 µl
2 x Puffer (<i>LightCycler 480 Probes Master</i>)	10 µl
100 µM <i>forward</i> Primer	0,4 µl
100 µM <i>reverse</i> Primer	0,4 µl
<i>Universal Probe Library</i> Sonde	0,2 µl
Nuklease-freies H ₂ O	8 µl

qRT-PCRs wurden nach dem Protokoll *mono color hydrolysis probes* (Roche) mit 45 PCR-Zyklen durchgeführt und mit der *LightCycler 480* Software ausgewertet.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Zellyse

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, in Standard-Lysepuffer aufgenommen, 15 Minuten auf Eis inkubiert und 30 Minuten bei 4500 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet.

Standard-Lysepuffer [25]

20 mM TRIS/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,2 % NP40, 0,5 mM EGTA, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, Proteaseninhibitor Cocktail

2.4.2 Co-Immunpräzipitation

Co-Immunpräzipitation (Co-IP) bezeichnet die Isolation eines Proteins und seiner Bindungspartner aus einem Zelllysats mittels spezifischer Antikörperbindung. Die Antikörper werden hierzu kovalent an Agarose-*beads* gebunden, die per Zentrifugation von der Lösung getrennt werden können. Ziel ist es, mit dem Protein assoziierte Protein-Komplexe zu isolieren. 2×10^6 1205lu-Zellen wurden in einer 100 mm Zellkulturplatte mit insgesamt 6 μ g einer Flag- oder Myc-*tag* enthaltenden Plasmid-DNA transfiziert und 48 Stunden inkubiert zur Expression des Transgens. Die Zellen wurden nach o.g. Protokoll in 400 μ l Standard-Lysepuffer aufgeschlossen und ein Teil des Lysats direkt in Lämmli-Puffer aufgenommen. Pro Bedingung wurden 40 μ l anti-Flag- oder anti-Myc-*beads* dreimal mit Lysepuffer gewaschen, mit dem restlichen Zelllysats vermischt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Die *beads* wurden 1 Minute bei 1000 U/min. abzentrifugiert und der Überstand in Lämmli-Puffer erhitzt. Nach dreimaligem Waschen in Lysepuffer wurden die *beads* ebenfalls direkt in Lämmli-Puffer aufgenommen. Von Lysat, Überstand und *beads* wurden SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt.

2.4.3 Subzelluläre Fraktionierung

5×10^6 Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, in 475 μ l hypotonem Lysepuffer suspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 μ l 10 % NP40 wurde das Lysat 10 Sekunden gevortext und anschließend 10 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytoplasma-Fraktion asserviert. Das *pellet* wurde in 500 μ l Zellextraktionspuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert, dabei alle

zehn Minuten gevortext und anschließend 30 Minuten bei 15.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde als Kern-Fraktion weiterverwendet.

Lysepuffer für subzelluläre Fraktionierungen

Hypotoner Lysepuffer	20 mM TRIS (pH 7,4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl ₂
Zellextraktionspuffer	100 mM TRIS (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % Desoxycholsäure, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 2 mM Na ₃ VO ₄ , 20 mM Na ₄ P ₂ O ₇

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach Größe in einem Gel aus polymerisiertem Acrylamid und N'-N'-Methylenbisacrylamid. Um eine Beeinflussung des Laufverhaltens durch Ladung und räumliche Struktur der Proteine zu verhindern, wurden Zelllysate mit Lämmli-Puffer (Biorad) verdünnt und 5 Minuten bei 95° C erhitzt. Die aufbereiteten Proben wurden auf ein 5 % Sammelgel und 10 % Trenngel aufgetragen und in SDS-Laufpuffer ein konstanter Stromfluss von 30 mA pro Gel angelegt. Als Größenmarker wurde eine Proteinleiter aufgetragen (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific). Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn eine ausreichende Auftrennung der Marker-Banden beobachtet wurde.

Zusammensetzung der Gele und Puffer

5 % Sammelgel	1 ml 4 x Sammelpuffer (0.5 M TRIS pH 6.8, 0,4 % SDS), 500 µl Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 40 µl 10 % APS, 4 µl TEMED, 2,5 ml H ₂ O
10 % Trenngel	2,5 ml 4 x Trennpuffer (3 M TRIS pH 8.5, 0,4 % SDS), 5 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED, 2,5 ml H ₂ O
Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 1,1 % SDS in H ₂ O

2.4.5 Western Blot und Immunoblot

Zur Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot) und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Immunoblot). Die Blots wurden mit einem *semidry*-Transfersystem 60 Minuten bei konstanter Stromstärke von 100 mA pro Gel durchgeführt. Um unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern, wurde die Membran nach dem Blot eine Stunde in *blocking*-Puffer gespült und dreimal in *TRIS-buffered saline* mit Tween 20 (TBST) gewaschen. Die Membran wurde zwei Stunden mit dem Primärantikörper in Antikörperpuffer nach Herstelleranweisung inkubiert und erneut dreimal in TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für eine weitere Stunde wurde die Membran mit einem

Horseradish-Peroxidase- (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper nach Herstellerprotokoll in *blocking*-Puffer inkubiert und erneut dreimal in TBST gewaschen. Durch Zugabe des Substrats Luminol wurde eine HRP-katalysierte Chemoluminiszenz-Reaktion gestartet, die mit dem *Alphamager* HP-System detektiert wurde.

Zusammensetzung der Puffer

Transfer-Puffer	192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 20 % Methanol in H ₂ O
TBST	50 mM TRIS (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 in H ₂ O
<i>blocking</i> -Puffer	5 % Magermilchpulver in TBST
Antikörper-Puffer	5 % BSA, 0,05 % NaN ₃ in TBST

2.4.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA dient dem quantitativen Nachweis eines Proteins in einer Lösung. Das nachzuweisende Protein wird durch Antikörperbindung in einem Well fixiert. Ein gegen das gleiche Protein gerichteter Sekundärantikörper wird in proportionaler Menge ebenfalls im Well fixiert und ist mit einem Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe eines chromogenen Substrats einen Farbumschlag katalysiert, der photometrisch quantifiziert werden kann. Eine 96-Well-Platte wurde nach Herstellerprotokoll (BD Biosciences) über Nacht mit Primärantikörper gegen *Interferon γ -induced protein 10* (IP-10) beschichtet, mit Waschpuffer gespült und für eine Stunde mit *assay diluent* geblockt. Nach erneutem Spülen wurden die Wells mit je 50 μ l des zu analysierenden Zellkulturüberstandes sowie einer IP-10-Standardreihe beladen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, die Wells erneut gespült und *working detector*-Lösung – bestehend aus Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper und Streptavidin-gekoppelter HRP – hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurden die Wells erneut gespült und die Substratlösung hinzugefügt. Der HRP-vermittelte Farbumschlag wurde durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt und im *Multiplate Reader Mithras* LB 940 (Berthold Technologies) quantifiziert. Anhand der Standardreihe wurde die IP-10-Konzentration im Zellkulturüberstand berechnet.

Zusammensetzung der Puffer für ELISA

<i>Coating</i> -Puffer	0,1 M Natriumcarbonat (pH 9,5)
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in PBS
<i>assay diluent</i>	10 % FCS in PBS
Substratlösung	Tetramethylbenzidin, H ₂ O ₂ (BD Biosciences)
Stop-Lösung	1 M H ₂ SO ₄

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

Zelllinien wurden kultiviert bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Konzentration. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Erreichten adhärenente Zellen eine Konfluenz von 80 % wurden sie mit 0,05 % Trypsin geerntet, 5 Minuten bei 400 *g* zentrifugiert, in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und mit 10 % der vorherigen Dichte weiter kultiviert. Zur Durchführung von Experimenten wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und tote von lebenden Zellen durch Färbung mit Trypan-Blau unterschieden. Zur Kryokonservierung wurden Zellen in der Wachstumsphase in FCS mit 10 % DMSO suspendiert und in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter um 1° C pro Minute auf -80° C gekühlt. Die humane Melanom-Zelllinie 1205lu ist gut geeignet für Untersuchungen der angeborenen antiviralen Immunität: Sie verfügt über einen intakten RLR-Signalweg, ist gut mit Modell-Viren wie Sendaivirus oder VSV infizierbar und zeigt ausgeprägte antivirale Antworten.

Zelllinien	Zellkulturmedium
1205lu, HEK 293, HEK 293T, CRIF1 f/f MEF	DMEM, 1 % L-Glutamin, 10 % FCS, 0,5 % Ciprofloxacin
BHK-21	GMEM, 1 % <i>Tryptose Phosphate Broth</i> , 10 % FCS, 0,5 % Ciprofloxacin
OCI, THP-1	RPMI, 1 % L-Glutamin, 10 % FCS, 0,5 % Ciprofloxacin

2.5.2 Transfektion von Nukleinsäuren

Für *knockdowns* mit siRNA wurden am Vortag 50.000 Zellen im 24-Well-Format ausplattiert. Pro Well wurden 20 pmol siRNA und 1 μ l *Lipofectamine RNAiMAX* Transfektionsreagens separat in je 50 μ l serumfreiem Medium (OptiMEM) verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden anschließend gemischt, weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in den Zellüberstand gegeben. Die Transfektion wurde nach 24 Stunden wiederholt und nach weiteren 24 Stunden die *knockdown*-Effektivität mittels qRT-PCR bestimmt. Die immunstimulatorischen RNAs 5'-ppp-RNA und poly(I:C) wurden – wenn nicht anders angegeben – einmalig in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml nach dem gleichen Protokoll transfiziert.

Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurden am Vortag 50.000 Zellen im 24-Well-Format ausplattiert. Pro Well wurden 0,25 μ g Plasmid-DNA, 0,75 μ l *GeneJuice*

Transfektionsreagens in 50 μl OptiMEM vermischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und direkt in den Zellüberstand gegeben.

Für die Transfektion von Nukleinsäuren in anderen Zellkulturformaten wurden die Mengen entsprechend extrapoliert:

Format	Zellen	Medium	RNA			Plasmid-DNA		
			siRNA	RNAi-MAX	Opti-MEM	DNA	Gene-Juice	Opti-MEM
96-Well	10.000	100 μl	4 pmol	0,2 μl	2x 10 μl	–	–	–
48-Well	20.000	200 μl	8 pmol	0,4 μl	2x 20 μl	0,1 μg	0,3 μl	20 μl
24-Well	50.000	500 μl	20 pmol	1 μl	2x 50 μl	0,25 μg	0,75 μl	50 μl
12-Well	100.000	1 ml	40 pmol	2 μl	2x 100 μl	0,5 μg	1,5 μl	100 μl
6-Well	250.000	2,5 ml	100 pmol	5 μl	2x 250 μl	1 μg	3 μl	200 μl
100 mm	2 Mio.	15 ml	–	–	–	6 μg	18 μl	1,2 ml

2.5.3 Virusinfektion von Zellen

VSV wt und VSV M51R wurden in OptiMEM auf die gewünschte *multiplicity of infection* (MOI) verdünnt, Sendai-Virus wurde in OptiMEM auf eine Konzentration von 40 U/ml verdünnt. Von adhären Zellen wurde das serumhaltige Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Viruslösung darauf gegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde das Inokulum abgenommen, nicht adsorbierte Viren mit PBS abgewaschen und erneut serumhaltiges Medium hinzugegeben.

2.5.4 Bestimmung der Viruslast in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung der Viruskonzentration in einer Lösung wurden zwei Methoden verwendet, die sich beide des zytopathischen Effekts von VSV und Sendai-Virus bedienen: *Plaque assay* und *50 % tissue culture infective dose* (TCID₅₀).

Plaque Assay

Für *plaque assays* wurde für jede Probe eine 6-Well-Platte mit je 1 Mio. BHK-21-Zellen pro Well ausplattiert und 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Von jeder virushaltigen Probe wurde eine Verdünnungsreihe 10^{-1} , 10^{-2} , ... 10^{-6} in OptiMEM hergestellt und die BHK-21-Zellen wie oben beschrieben infiziert. Anstatt serumhaltigen Mediums wurden die Zellen mit 2 ml einer 40° C warmen, 0,75 % Agaroselösung aus gleichen Teilen PBS und OptiMEM bedeckt. Das gallertige Agarose-Medium verhindert die horizontale Diffusion freigesetzter Viruspartikel, sodass von einer infizierten Zelle

ausschließlich die Nachbarzellen infiziert werden und sichtbare Lücken im Zellrasen – „*plaques*“ – hinterlassen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Agarose-Medium abgenommen, die Zellen mit je 1 ml Kristallviolettlösung gefärbt und mit Wasser gewaschen. Unter der Annahme, dass jedes *plaque* durch ein einzelnes Viruspartikel entstanden ist, wurde nach Auszählung der *plaques* die Viruslast in der Ausgangslösung berechnet und als *plaque-forming units* (PFU) angegeben.

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques}}{\text{Verdünnung} \cdot \text{Volumen der Infektionslösung}} = \text{Konzentration der Viruslösung in } \frac{\text{PFU}}{\text{ml}}$$

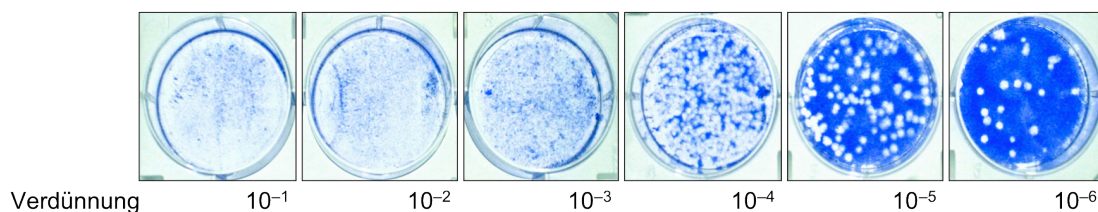


Abbildung 1: Plaque Assay

BHK-21-Zellen mit 100 % Konfluenz wurden mit Zellkulturüberstand in unterschiedlichen Verdünnungen infiziert, 24 h unter einem 0,75 % Agarose-Medium inkubiert und anschließend mit Kristallviolett angefärbt.

50 % Tissue Culture Infective Dose (TCID₅₀)

Zur Viruslast-Bestimmung mittels TCID₅₀ wurde für jede Probe eine 96-Well-Platte mit 10.000 BHK-21-Zellen pro Well ausplattiert. Von jeder virushaltigen Probe wurde eine Verdünnungsreihe 10⁻¹, 10⁻², ... 10⁻¹² in OptiMEM hergestellt und die BHK-21-Zellen wie oben beschrieben in Oktuplikaten infiziert. Nach einer Woche Inkubation wurde dokumentiert, bis zu welchen Verdünnungen ein zytopathischer Effekt aufgetreten ist und TCID₅₀ mit dem TCID₅₀-calculator nach Spearman & Kärber [165] berechnet.

2.5.5 Lentivirale RNAi

Genetische Manipulationen durch Lentiviren

Retrovirale Vektoren integrieren stabil in das Wirtsgenom und ermöglichen die dauerhafte Expression eines Transgens. Während einfache Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren, können Lentiviren auch ruhende Zellen wie Neuronen oder Makrophagen infizieren. Neben den drei retroviralen Genen *gag*, *env* und *pol* besitzen Lentiviren sogenannte akzessorische Gene, die regulatorische Funktionen besitzen oder für Pathogenitätsfaktoren kodieren. Ausgehend von HIV, dem bestcharakterisierten Lentivirus,

werden kontinuierlich neue Vektoren entwickelt mit dem Ziel, Transduktionseffizienz und biologische Sicherheit zu optimieren. Für die sichere Anwendung *in vivo* und *in vitro* müssen lentivirale Vektoren apathogen und replikationsdefizient sein. Hierzu wurden sukzessive die akzessorischen Gene in HIV deletiert und die essentiellen viralen Gene auf mehrere Expressionskassetten verteilt. Nur auf dem Transfer-Vektor, der das Transgen enthält, sind auch die *cis*-Elemente zur Verpackung des Vektors in das Lentiviruspartikel und die Integration des Transgens in das Wirtsgenom enthalten. Ein Verpackungsplasmid trägt die viralen *trans*-Elemente *gag* und *pol*, die für virale Strukturproteine und Replikations-Enzyme kodieren. Ein weiteres Plasmid kodiert für ein virales Hüllprotein, das den Tropismus des Virus bestimmt, hier wird als Ersatz für das retrovirale *env*-Gen häufig das VSV-Glykoprotein verwendet. Da die Genkassetten mit den viralen Hüllprotein- und Strukturgenen nicht in die Viruspartikel aufgenommen werden, sind die produzierten Viren replikationsdefizient. Zur Produktion von Lentiviren werden die genannten Plasmide in eine Verpackungszelllinie transfiziert, welche dann die Viruspartikel produziert [166].

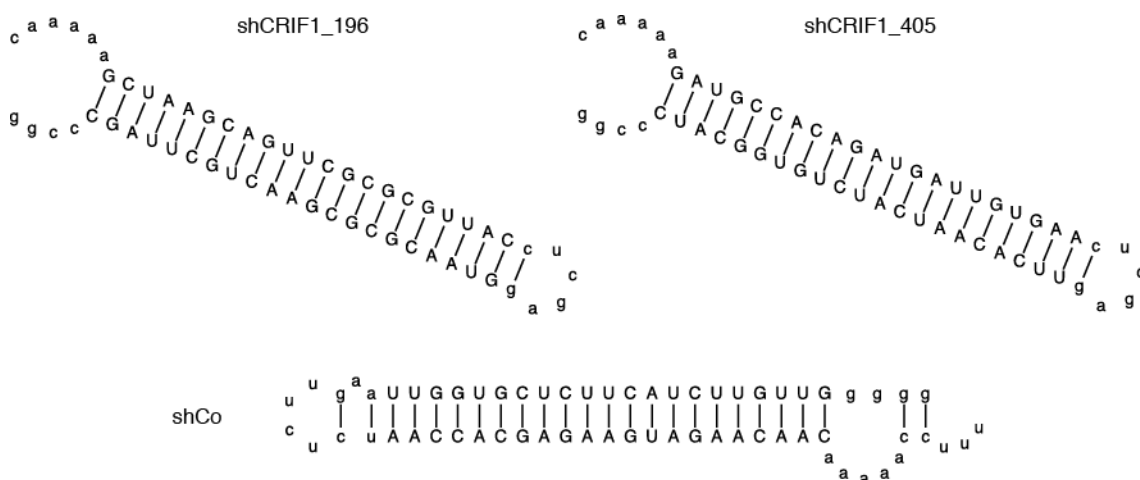


Abbildung 2: Haarnadelstruktur der in dieser Arbeit verwendeten shRNAs

Die shRNA-Sekundärstruktur wurde berechnet mit *CLC Main Workbench 7* (CLC bio).

In dieser Arbeit wurden Lentiviren eingesetzt zur Herstellung von Zelllinien mit einer Doxycyclin-induzierbaren shRNA. Zur Lentivirus-Produktion kam ein Verpackungssystem der zweiten Generation zur Anwendung, bei dem sämtliche akzessorischen Gene mit Ausnahme von *tat* und *rev* deletiert sind und welches als Selektionsmarker GFP exprimiert. Die viralen *trans*-Elemente liegen auf dem Verpackungsplasmid pSPAX2, auf einem dritten Plasmid liegt VSV-G als Hüllprotein. Die shRNAs stehen unter der Kontrolle des Doxycyclin-induzierbaren U6-Promotors [161].

Herstellung von Lentiviren

Zur Herstellung von Lentiviren wurden 7,75 μg Transfer-Vektor (pLKO2tetO2mod-shCo, -shCRIF1_196 oder -shCRIF1_405), 5 μg pSPAX2 und 2,7 μg pVSV-G in 750 μl OptiMEM verdünnt sowie parallel 38 μl *Lipofectamine 2000* Transfektionsreagens in 750 μl OptiMEM verdünnt. Nach 5 Minuten Inkubation wurden die beiden Lösungen gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. HEK 293T-Zellen wurden auf eine Konzentration von 6×10^5 Zellen/ml in antibiotikafreiem Transfektionsmedium verdünnt. 10 ml der Zellsuspension wurden mit der Transfektionslösung vermischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in einer 100 mm Zellkulturplatte ausplattiert und für 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurde das Transfektionsmedium durch 10 ml 37° C warmes, antibiotikafreies Verpackungsmedium ersetzt und zur Produktion der Lentiviren weitere 24 Stunden inkubiert.

Pro shRNA-Konstrukt wurden je 1×10^5 Zellen der Linien 1205lu und HEK 293 bzw. je 6×10^5 Zellen der Linien THP-1 und OCI im 12-Well-Format ausplattiert. Am Folgetag wurde das Kulturmedium entfernt und je 1,5 ml der virushaltigen Überstände durch einen 0,45 μm Filter auf die zu transduzierenden Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Viruslösung durch reguläres Medium ersetzt, die GFP-Expression überprüft, die Zellen wurden vereinzelt und je 1-3 GFP-exprimierende Klone expandiert.

Zur Induktion der shRNA wurden die Zelllinien mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin stimuliert und nach 48 Stunden die Induktion wiederholt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen für Experimente verwendet und die *knockdown*-Effektivität per qRT-PCR bestimmt.

Zellkulturmedien für Lentivirusproduktion

Transfektionsmedium	OptiMEM, 10 % FCS
Verpackungsmedium	DMEM, 1 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 10 % FCS

2.5.6 Konfokalmikroskopie lebender Zellen

Je 50.000 1205lu-Zellen wurden in *CELLview glass bottom dishes* ausplattiert und am Folgetag wie oben beschrieben mit je 0,25 μg Venus-exprimierenden Plasmiden transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zum Anfärben der Mitochondrien mit 25 nM *Mitotracker Red CMXRos* und zur Färbung der DNA mit Hoechst-33342 1:20.000 behandelt. In einer Kammer mit 37° C und 5 % CO₂ wurden live-Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 gemacht.

2.5.7 Biolumineszenz-Resonanz Energie-Transfer (BRET)

BRET ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen. Sie basiert auf dem Prinzip des Energie-Transfers von einem Energie-Donor auf einen fluoreszierenden Akzeptor über kurze Distanzen innerhalb des Förster-Radius von 100 Å. Hierzu wird eines von zwei zu untersuchenden Proteinen mit der Renilla-Luciferase (hRLuc) als Energie-Donor und das andere mit dem gelb fluoreszierenden Protein Venus als Energie-Akzeptor fusioniert, sie bilden so gemeinsam ein BRET-Paar. Interagieren die Proteine miteinander, kommen Donor und Akzeptor in enge Nachbarschaft und nach Oxidation des Luciferase-Substrats Coelenterazin entsteht ein Energie-Transfer von hRLuc zu Venus. Die daraus resultierende Energie-Emission des Akzeptors kann detektiert werden und wird angegeben als Verhältnis zur Donor-Lumineszenz (BRET-ratio). Durch Sättigungsexperimente kann die Affinität einer Interaktion untersucht werden: Die sukzessive Erhöhung des Akzeptor-/Donor-Verhältnisses führt bei positiver Protein-Protein-Interaktion zu einem hyperbolischen Anstieg der BRET-ratios, der ein Plateau erreicht wenn alle Donor-Proteine durch Interaktion mit Akzeptor-Proteinen gesättigt sind. Unspezifische Interaktionen aufgrund zufälliger Kollision des BRET-Paars führen bei Titration des Akzeptor-/Donor-Verhältnisses dagegen zu linearem Anstieg der BRET-ratios. Dies erlaubt eine Unterscheidung falsch-positiver von positiven Interaktionen [167].

Nukleofektion von HEK 293-Zellen wurde mit dem *Cell Line Nucleofector Kit* (Lonza) durchgeführt. Insgesamt 1 µg BRET-Vektoren im Akzeptor-/Donor-Verhältnis von 3:1 wurden in 10 µl Elektroporations-Puffer in 96-Well-Zellkulturplatten verdünnt. Für Sättigungsexperimente wurde das Akzeptor-/Donor-Verhältnis von 1:6 bis 15:1 titriert. Die HEK 293-Zellen wurden geerntet und in vorgewärmtem Elektroporations-Puffer in einer Konzentration von $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert. 16,6 µl der Zellsuspension – entsprechend $1,5 \times 10^5$ Zellen – wurden zu den vorbereiteten BRET-Plasmiden hinzugefügt, davon wiederum 20 µl in 96-Küvetten-Nukleofektionsplatten (Lonza) überführt und mit dem Gerät *Nucleofector 2* (Lonza) elektroporiert. Nach der Nukleofektion wurden 80 µl vorgewärmtes DMEM ohne Phenolrot zu jeder Probe hinzugefügt, davon wiederum 50 µl in 96-Well-Zellkulturplatten übertragen, in denen bereits 150 µl DMEM vorgelegt war. Nach 24 Stunden Inkubation wurden 170 µl des Zellüberstands abgenommen und 70 µl Coelenterazin (30 µM) hinzugefügt. Nach 2 Minuten Inkubation wurden über einen Zeitraum von einer Minute jede Sekunde das hRLuc-Signal bei 485 nm und das BRET-Signal bei 535 nm detektiert und gemittelt. Als Positivkontrollen wurden ein Venus-RLuc-Fusionskonstrukt und das als Interaktoren bekannte BRET-Paar hRLuc-bJun-Venus-

bFos verwendet. Als Negativkontrolle wurden hRLuc und Venus als separate Konstrukte exprimiert und der Wert BRET/hRLuc als Korrekturfaktor cf von jedem BRET-Paar abgezogen. BRET-*ratios* R wurden nach der folgenden Formel berechnet:

$$R = \frac{I_A}{I_D} - cf$$

I_A	Intensität der Akzeptor-Luminiszenz bei 535 nm
I_D	Intensität der Donor-Luminiszenz bei 485 nm
cf	Korrekturfaktor ($\text{BRET}_{\text{Kontrolle}}/\text{hRLuc}_{\text{Kontrolle}}$)

Für die Auswertung wurden I_D -Werte ≥ 3500 verlangt. In den Screenings wurde eine positive Interaktion bei BRET-*ratios* $\geq 0,03$ angenommen, in den Bestätigungsexperimenten bei Erreichen einer Sättigung mit BRET-*ratios* $\geq 0,03$.

2.5.8 Bestimmung des Sauerstoff-Verbrauchs und der Laktat-Produktion in lebenden Zellen

Der XFe96 *Analyzer* (Seahorse Bioscience) kann gleichzeitig Veränderungen des pH-Werts (*extracellular acidification rate*, ECAR) und der Sauerstoffkonzentration (*oxygen consumption rate*, OCR) im Zellkulturmedium über die Zeit messen. ECAR und OCR werden als Surrogatmarker für anaeroben bzw. aeroben Stoffwechsel herangezogen. In XFe96 Kultur-Mikroplatten wurden pro Well 3×10^4 1205lu-Zellen mit Doxycyclin-induzierbarem shCRIF1_405-Konstrukt oder 1205lu wt-Zellen in DMEM ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit $3 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin oder dem entsprechenden Volumen PBS induziert und die Induktion nach 48 Stunden wiederholt. Nach weiteren 48 Stunden wurde das Kulturmedium durch $80 \mu\text{l}$ XF Proben-Medium ersetzt und über Nacht inkubiert. Gelöstes O_2 und der pH-Wert wurden daraufhin in den Wells der vorbereiteten Platten in einem XFe96 *Analyzer* kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Minuten gemessen und daraus die Rate des Sauerstoff-Verbrauchs (OCR) und der extrazellulären Ansäuerung (ECAR) aus den Veränderungen dieser Parameter über die Zeit errechnet. Diese Messungen wurden insgesamt siebenmal über einen Zeitraum von einer Stunde wiederholt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von CRIF1 als antivirales Protein

3.1.1 siRNA-vermittelter knockdown von CRIF1 führt zu verminderter Ausschüttung antiviraler Zytokine nach Virusinfektion und Stimulation mit 5'-ppp-RNA

Um den Einfluss von CRIF1 auf die Zytokinantwort nach Virusinfektion zu untersuchen, wurden *loss of function*-Experimente mit siRNA-vermitteltem *knockdown* von CRIF1 in 1205lu-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde die Kontroll-siRNA Co4, die kein humanes Zielgen besitzt, verwendet, als Positivkontrolle eine siRNA gegen RIG-I. Anschließend wurden die Zellen mit 5'-ppp-RNA, einem spezifischen Liganden für RIG-I, stimuliert oder mit dem über RIG-I erkannten Sendai-Virus infiziert und die Aktivierung des Interferonsystems über die Konzentration von IP-10 im Zellüberstand gemessen. In stimulierten und in virusinfizierten Zellen konnte nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von CRIF1 eine Reduktion der IP-10-Ausschüttung beobachtet werden (Abbildung 3).

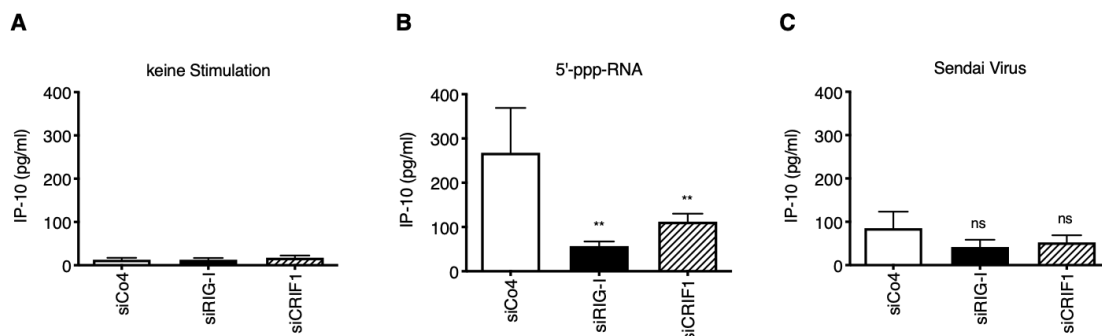


Abbildung 3: siRNA-vermittelter *knockdown* von CRIF1 führt zu verminderter Ausschüttung antiviraler Zytokine nach Virusinfektion und Stimulation mit 5'-ppp-RNA

1205lu-Zellen wurden in Duplikaten (siCo4, siRIG-I) bzw. in Quadruplikaten (siCRIF1) mit 40 pmol/ml siRNA gegen RIG-I und CRIF1 sowie mit Kontroll-siRNA behandelt und entweder nicht (**A**) oder mit 1 µg/ml 5'-ppp-RNA (**B**) bzw. mit 40 U/ml Sendai-Virus (**C**) stimuliert. 24 h nach Stimulation wurde die Konzentration von IP-10 im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Daten gezeigt als Mittelwerte ± SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,001$.

3.1.2 siRNA-vermittelter knockdown von CRIF1 führt zu vermehrter Virusproduktion in infizierten Zellen

Um den Einfluss von CRIF1 auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden 1205lu-Zellen mit siRNA gegen CRIF1, Kontroll-siRNA (Co4) oder einer siRNA gegen RIG-I behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 MOI der Virusmutante VSV M51R infiziert. Diese besitzt eine Methionin-zu-Arginin-Substitution an Position 51 des Matrix-Proteins, wodurch dieses den nukleären Export von mRNA nicht mehr hemmen kann und der Zellmetabolismus und die Produktion von Typ-I-Interferonen nicht beeinträchtigt werden. In den Zellkulturüberständen wurde die Viruskonzentration mittels *plaque assay* bestimmt. Sowohl *knockdown* von RIG-I als auch von CRIF1 führten zu einer Erhöhung der Viruslast in den Zellüberständen (Abbildung 4).

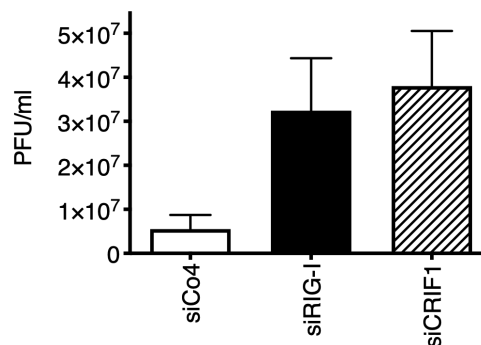


Abbildung 4: Gesteigerte Virusreplikation in infizierten Zellen nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von CRIF1

1205lu-Zellen wurden mit 40 pmol/ml siCo4, siRIG-I und siCRIF1 behandelt und mit 5 MOI VSV M51R infiziert. Nach 10-24 h wurde die Viruskonzentration in den Zellkulturüberständen per *plaque assay* bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte \pm SEM von n = 2 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Überexpression von CRIF1 führt zu vermehrter Ausschüttung von IP-10

Da nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von CRIF1 eine reduzierte IP-10-Ausschüttung auf Stimulation mit 5'-ppp-RNA oder VSV beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob die Überexpression von CRIF1 eine vermehrte Ausschüttung antiviraler Zytokine nach Stimulation zur Folge hat. Hierzu wurden 1205lu-Zelllinien hergestellt, die CRIF1 mit einem c'-terminalen mCherry-tag stabil überexprimieren. Diese Zellen sowie 1205lu-Wildtyp-Zellen wurden mit 5'-ppp-RNA, transfiziertem poly(I:C) als Liganden für RIG-I und MDA5, untransfiziertem poly(I:C) als Liganden für TLR3, sowie rekombinantem IFN- α stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit einer Kontroll-RNA ohne

Triphosphat-Modifikation (Co4) transfiziert oder unstimuliert belassen. Nach 24 Stunden wurde die Ausschüttung von IP-10 in den Zellüberständen per ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass Überexpression von CRIF1 bei allen Stimuli zu einer signifikanten Steigerung der IP-10-Produktion führt (Abbildung 5). Da die verwendeten Stimuli unterschiedliche Signalwege aktivieren – RLRs, TLR3 oder IFNAR – postulierten wir einen auf alle drei genannten Signalwege gleichermaßen verstärkend wirkenden antiviralen Effekt von CRIF1.

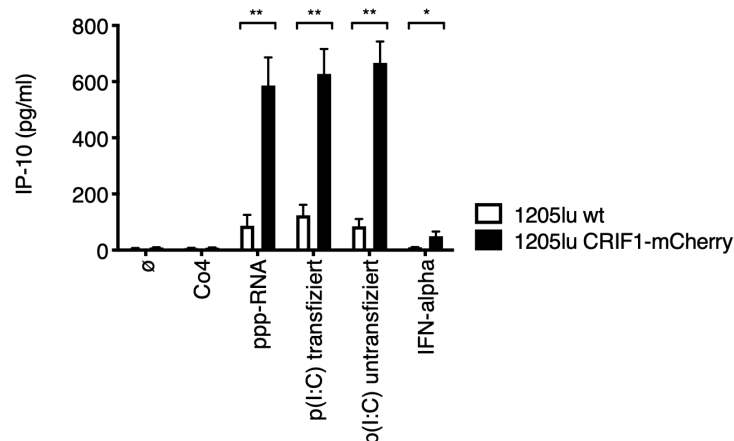


Abbildung 5: Überexpression von CRIF1 führt zu vermehrter Ausschüttung von IP-10

Eine CRIF1-mCherry überexprimierende 1205lu-Zelllinie sowie Wildtyp-1205lu-Zellen wurden mit 40 pmol/ml Co4, 1 µg/ml 5'-ppp-RNA, 1 µg/ml transfiziertem poly(I:C), 10 µg/ml untransfiziertem poly(I:C) und 1000 U/ml IFN-α stimuliert. Nach 24 h wurde mittels ELISA die IP-10-Konzentration in 1:10-verdünnten Zellüberständen bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte ± SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten bzw. Quadruplikaten und repräsentativ für eine weitere generierte 1205lu-CRIF1-mCherry-Zelllinie. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

3.1.4 Stimulation mit 5'-ppp-RNA induziert CRIF1-mRNA

Stimulation von Zellen mit Liganden von Mustererkennungsrezeptoren führt in einem verstärkenden *feed-forward-loop* zu einer Hochregulation von zahlreichen Faktoren des angeborenen Immunsystems. So gehören die RIG-I-like Helikasen zu den am stärksten induzierten Genen nach einer Virusinfektion. Die transkriptionelle Regulation eines Gens im Rahmen der Aktivierung der antiviralen Immunantwort ist daher weiteres Indiz dafür, dass das entsprechende Gen eine Funktion in der antiviralen Abwehr haben könnte. Daher wurde die Expression von CRIF1 nach Stimulation mit 5'-ppp-RNA untersucht. Die 1205lu-Zelllinien shCo, sh196_C1, sh405_C1 und sh405_C2 wurden ohne vorherige Doxycyclin-Induktion mit 5'-ppp-RNA stimuliert. Nach 7, 15 und 24 Stunden wurde die Expression von CRIF1-mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. Als Vergleich diente die

jeweilige unstimulierte Zelllinie. Es zeigte sich, dass eine Stimulation von 1205lu-Zellen mit 5'-ppp-RNA zu einer signifikanten Steigerung der CRIF1-Expression führt (Abbildung 6).

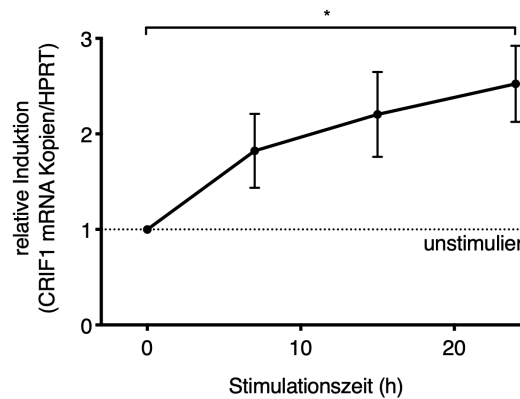


Abbildung 6: Stimulation mit 5'-ppp-RNA induziert CRIF1-mRNA

Vier unterschiedliche 1205lu-Zelllinien wurden in Duplikaten mit 500 ng/ml 5'-ppp-RNA stimuliert oder unstimuliert belassen und CRIF1-mRNA mittels qRT-PCR nach 0 / 7 / 15 / 24 h gemessen. Angegeben die relative Induktion von CRIF1 im Vergleich zu den unstimulierten Bedingungen. Gezeigt Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$.

3.2 Etablierung eines lentiviralen Systems Doxycyclin-induzierbarer short-hairpin-RNAs

Aufgrund erheblicher Toxizität der Transfektionsreagenzien und Unzuverlässigkeit des *knockdowns* bei Verwendung von siRNAs wurde ein System mit stabilem CRIF1-*knockdown* durch lentivirale Transduktion von shRNAs etabliert. Zunächst wurden 1205lu-Zellen mit Lentiviren basierend auf dem Transfektor pLKO2mod-EGFP-WPRE transduziert, sodass diese konstitutiv eine CRIF1-shRNA exprimierten. Die Zellen zeigten zwar zunächst einen effektiven *knockdown*, stellten nach vier bis fünf Tagen jedoch die Proliferation ein und nach wenigen Zellpassagen nahm die per qRT-PCR nachgewiesene *knockdown*-Effektivität sukzessive ab (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser proliferationshemmenden Effekte des Verlustes von CRIF1 erwies sich ein konstitutiver *knockdown* daher als ungeeignetes Modell, um die Funktion von CRIF1 zu untersuchen. Die Verwendung eines Doxycyclin-induzierbaren shRNA-Systems basierend auf dem Transfektor pLKO2tetO2mod-EGFP-T2A-tetR-WPRE ermöglichte schließlich zuverlässig hohe *knockdown*-Effektivitäten bei fehlender Beeinträchtigung der Zellproliferation.

Zur Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Modells wurden die Zelllinien 1205lu, HEK 293, THP-1 und OCI jeweils mit den Lentiviren shCo, shCRIF1-196 und shCRIF1-405 transduziert, die Zellen vereinzelt, daraus je ein bis drei GFP-exprimierende Klone ausgewählt und diese expandiert. Die Klone wurden zweimal im Abstand von 48 Stunden mit 2 μ g/ml Doxycyclin oder dem gleichen Volumen PBS induziert und nach weiteren 48 Stunden wurde die Effektivität des CRIF1-*knockdowns* mittels qRT-PCR bestimmt. In 1205lu- und HEK 293-Zellen ließen sich gute *knockdown*-Effektivitäten erzielen, THP-1- und OCI-Zellen erwiesen sich bei unzureichendem *knockdown* dagegen als nicht geeignet für lentiviralen CRIF1-*knockdown* (Abbildung 7).

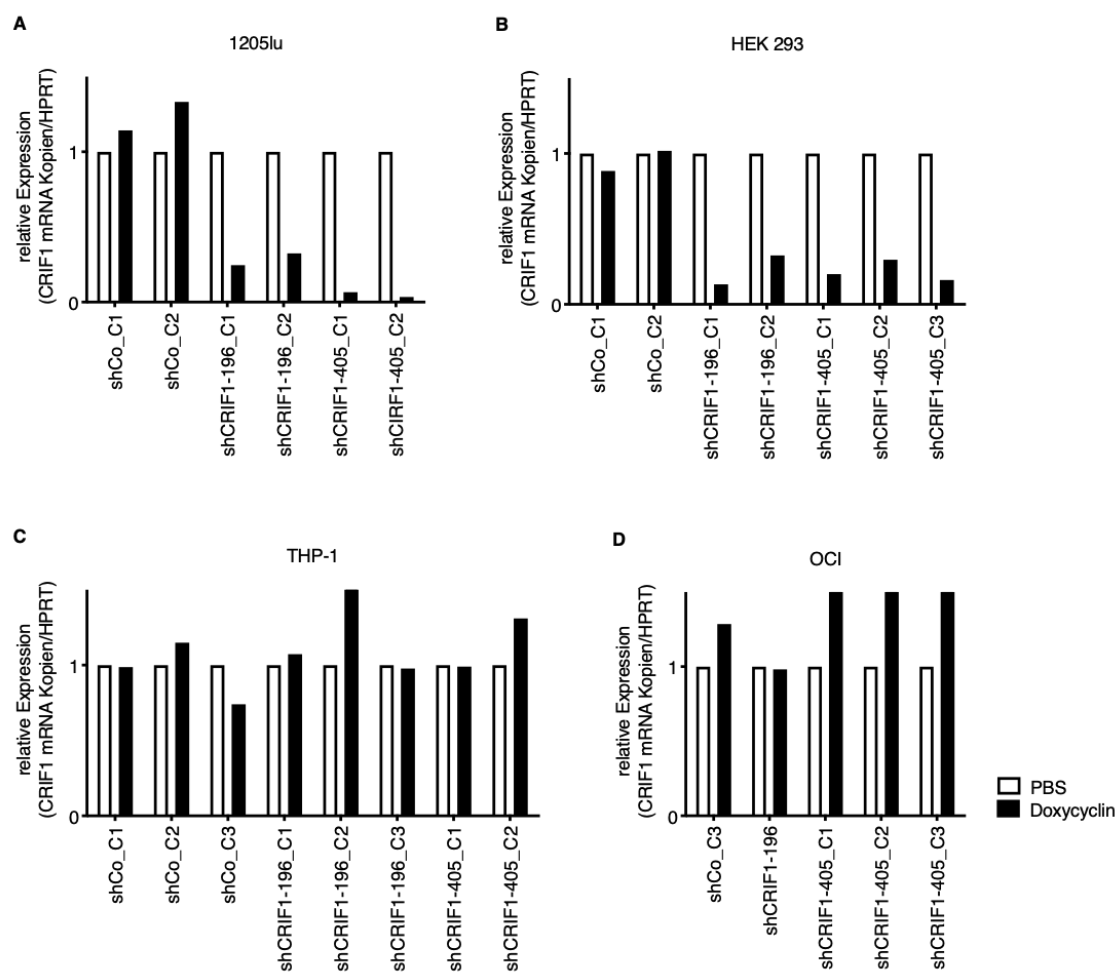


Abbildung 7: Knockdown-Effektivität lentiviraler shRNAs in unterschiedlichen Zelllinien

1205lu-Zellen (**A**), HEK 293-Zellen (**B**), THP-1-Zellen (**C**) und OCI-Zellen (**D**) wurden mit Lentiviren transduziert, welche die Doxycyclin-induzierbaren shRNAs shCo, shCRIF1-196 oder shCRIF1-405 exprimieren. Die Zellen wurden vereinzelt und jeweils 1-3 GFP-exprimierende Klone expandiert. Diese wurden zweimal im Abstand von 48 h mit 2 μ g/ml Doxycyclin bzw. dem gleichen Volumen PBS induziert und nach weiteren 48 h die CRIF1-Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

3.3 Die ursprünglichen Beobachtungen können im Doxycyclin-induzierbaren shRNA-System nicht reproduziert werden

Unter der Annahme, dass ein lentivirales Doxycyclin-induzierbares shRNA-System eine stabile *knockdown*-Effektivität ermöglicht, sollten die Ergebnisse der siRNA-Studien im shRNA-System reproduzierbar sein.

3.3.1 Knockdown von CRIF1 mittels shRNA führt nicht zu verminderter Expression von IP-10 oder IFN- β nach Stimulation mit 5'-ppp-RNA, poly(I:C) oder Sendai-Virus

Um den Effekt von CRIF1 auf die Ausschüttung antiviraler Zytokine zu untersuchen, wurden sämtliche der generierten shRNA-Zelllinien, in denen sich ein guter CRIF1-*knockdown* induzieren ließ (Abbildung 7), nach etabliertem Protokoll mit Doxycyclin bzw. PBS behandelt und mit 5'-ppp-RNA, poly(I:C) oder Sendai-Virus stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Ausschüttung von IP-10 mittels ELISA oder die Expression von IFN- β mittels qRT-PCR bestimmt. Unerwarteterweise zeigte sich jedoch in keiner der Zelllinien ein signifikanter Unterschied in der Produktion von IP-10 oder Expression von IFN- β nach der Induktion der CRIF1-shRNA, obwohl die Induktion tatsächlich zu einer reduzierten Expression von CRIF1 führte (Abbildung 8). In den mit 5'-ppp-RNA behandelten 1205lu-Zelllinien konnte – unabhängig vom shRNA-Konstrukt – eine reduzierte IP-10-Ausschüttung in allen Doxycyclin-behandelten Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 8A). Die Signifikanz dieser Beobachtung ist unklar, in anderen Zelllinien und mit anderen Stimuli konnte dieser Effekt nicht reproduziert werden.

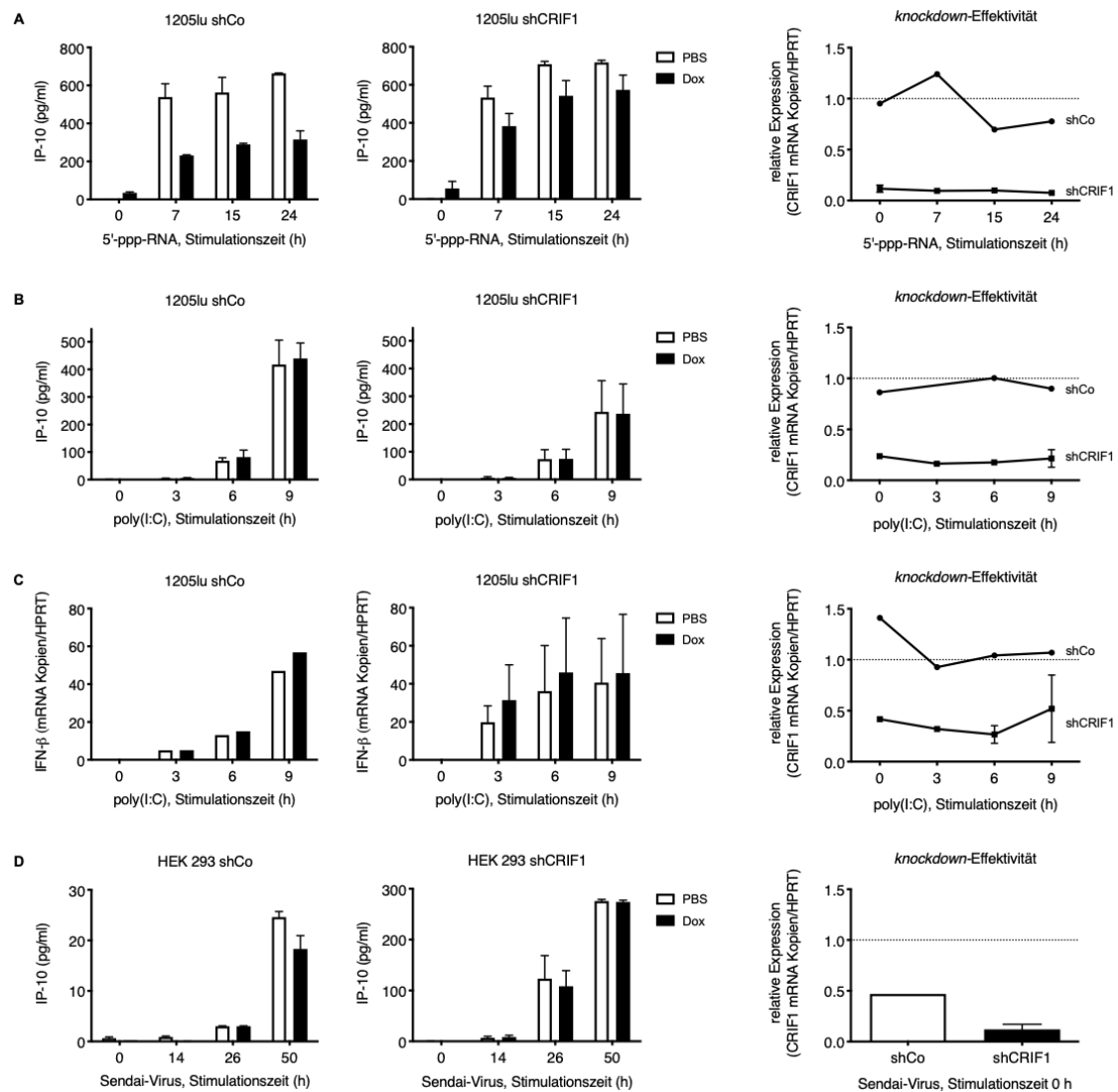


Abbildung 8: shRNA-vermittelter *knockdown* von CRIF1 führt nicht zu verminderter Expression von IP-10 oder IFN-β nach Stimulation mit 5'-ppp-RNA, poly(I:C) oder Sendai-Virus

Zelllinien mit induzierbarer Kontroll- oder CRIF1-shRNA wurden in Duplikaten zweimal im Abstand von 48 h mit 2 µg/ml Doxycyclin oder PBS induziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit 5'-ppp-RNA, poly(I:C) oder Sendai-Virus stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Konzentration von IP-10 im Überstand mittels ELISA und die Genexpression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bestimmt. Die 1205lu-Linien shCo_C1, shCRIF1-196_C1, shCRIF1-405_C1 und shCRIF1-405_C2 wurden nach Doxycyclin-Induktion mit 1 µg/ml 5'-ppp-RNA stimuliert und nach 7 / 15 / 24 h die Konzentration von IP-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt (**A**). Die 1205lu-Linien shCo_C4, shCRIF1-196_C1 und shCRIF1-196_C2 wurden nach Doxycyclin-Induktion mit 5 ng/ml poly(I:C) stimuliert und nach 3 / 6 / 9 h die Konzentration von IP-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt (**B**). Die 1205lu-Linien shCo_C4, shCRIF1-196_C1 und shCRIF1-196_C2 wurden nach Doxycyclin-Induktion mit 5 ng/ml poly(I:C) stimuliert und nach 3 / 6 / 9 h die Expression von IFN-β-mRNA bestimmt (**C**). HEK 293-shCo_C2, shCRIF1-196_C1 und shCRIF1-405_C3 wurden nach Doxycyclin-Induktion mit Sendai-Virus stimuliert und nach 14 / 26 / 50 h die Konzentration von IP-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt (**D**). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM. Zum Zeitpunkt 0 wurden unstimulierte Zellen analysiert. Die *knockdown*-Effektivitäten sind als Verhältnis der CRIF1-Expression in der Doxycyclin- gegenüber der PBS-induzierten Bedingung angegeben.

3.3.2 Knockdown von CRIF1 mittels shRNA führt nicht zu vermehrter, sondern zu verminderter Virusproduktion in infizierten Zellen

Um den Einfluss von CRIF1 auf die Ausschüttung von Viruspartikeln zu untersuchen, wurden die 1205lu-Zelllinien shCo_C1 und shCRIF1-405_C2 nach Protokoll mit PBS bzw. Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 MOI VSV wt oder 1 MOI VSV M51R infiziert. Nach 36 Stunden wurde die Konzentration von Viruspartikeln im Überstand mittels TCID₅₀ bestimmt. Ferner wurde aus den Zellen VSV-Nukleoprotein-mRNA und CRIF1-mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. Unter CRIF1-*knockdown*-Bedingungen konnte eine erhebliche Reduktion der Virusproduktion beobachtet werden und es war nahezu keine VSV-N-mRNA mehr nachweisbar. In geringerem Maße konnte jedoch auch nach Expression der Kontroll-shRNA eine Reduktion der Viruskonzentration im Zellüberstand und der VSV-N-mRNA in den Zelllysaten festgestellt werden. Ferner beobachteten wir eine deutliche Verminderung der viralen Zytotoxizität in sämtlichen Doxycyclin-behandelten Proben. Auch in diesem Fall ist unklar, ob Doxycyclin direkt zytoprotektiv wirkt oder ob dies ein Effekt der niedrigeren Viruslast ist.

Zusammengefasst konnten wir entgegen unserer Erwartung in den Zellen mit Doxycyclin-induzierter Produktion einer gegen CRIF1 gerichteten shRNA eine signifikante Reduktion der Virusproduktion in VSV-infizierten Zellen feststellen (Abbildung 9), während sich kein eindeutiger Effekt auf die Zytokinproduktion zeigte (Abbildung 8).

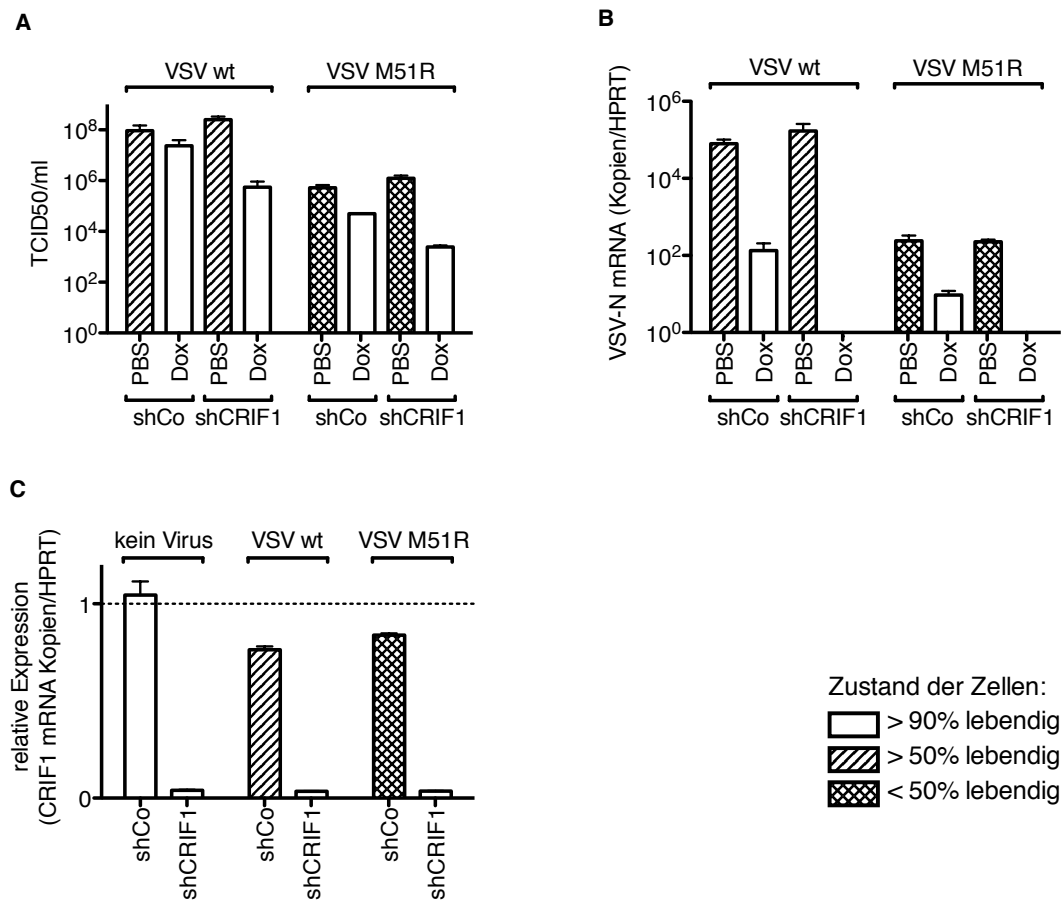


Abbildung 9: shRNA-vermittelter *knockdown* von CRIF1 führt zu verminderter Virusproduktion in infizierten Zellen

1205lu-Zellen mit induzierbarer Kontroll-shRNA (shCo_C1) und induzierbarer CRIF1-shRNA (shCRIF1-405_C2) wurden zweimal im Abstand von 48 h mit 2 μ g/ml Doxycyclin oder PBS induziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit 0,1 MOI VSV wt oder 1 MOI VSV M51R infiziert, nach 60 min einmal mit PBS gewaschen und das Medium gegen DMEM getauscht. Nach 36 h wurde die Viruskonzentration in den Überständen mittels TCID₅₀ bestimmt (**A**). Aus den Zellen wurde RNA extrahiert und mittels qRT-PCR die Expression von VSV-N-mRNA (**B**) und von CRIF1-mRNA bestimmt zur Berechnung der *knockdown*-Effektivität (**C**). Gezeigt sind Mittelwerte von n = 3 unabhängigen Experimenten (VSV wt) und Daten von n = 1 Experiment (VSV M51R). Die *knockdown*-Effektivitäten sind als Verhältnis der CRIF1-Expression in der Doxycyclin- gegenüber der PBS-induzierten Bedingung angegeben.

3.4 CRIF1 ist ein mitochondriales Protein

3.4.1 Subzelluläre Fraktionierungen virusinfizierter Zellen

Die Funktion eines Proteins ist entscheidend von seiner subzellulären Lokalisation abhängig. Frühe Arbeiten charakterisierten CRIF1 als nukleäres Protein, viele Signalwege der Viruserkennung und -abwehr sind jedoch im Zytoplasma lokalisiert.

Um die Lokalisation von CRIF1 während einer Virusinfektion zu untersuchen, wurden 1205lu-Zellen mit VSV M51R infiziert oder mit serumfreiem Medium behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in Zellkerne und Zytoplasma fraktioniert und mittels Western Blot analysiert, als Marker für die Reinheit der Fraktionen dienten Histon H3 und MyD88. Es zeigte sich eine starke Anreicherung von CRIF1 in der Zytoplasma-Fraktion (Abbildung 10A). Das Experiment wurde wiederholt mit MEFs, die mit Sendai-Virus infiziert oder mit serumfreiem Medium behandelt und nach dem gleichen Protokoll fraktioniert wurden. Im Western Blot zeigte sich ebenfalls eine deutliche Anreicherung von CRIF1 in der Zytoplasma-Fraktion, ferner war diese stark positiv für die Mitochondrien-Marker TOM40, Cytochrom C und *heat shock protein* 60 (HSP60) (Abbildung 10B). Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Bedingungen waren nicht feststellbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass CRIF1 mit der verwendeten Fraktionierungsmethode nicht im Zellkern nachweisbar ist und dass sich unabhängig von einer Virusinfektion CRIF1 und Mitochondrien in derselben Fraktion nachweisen lassen.

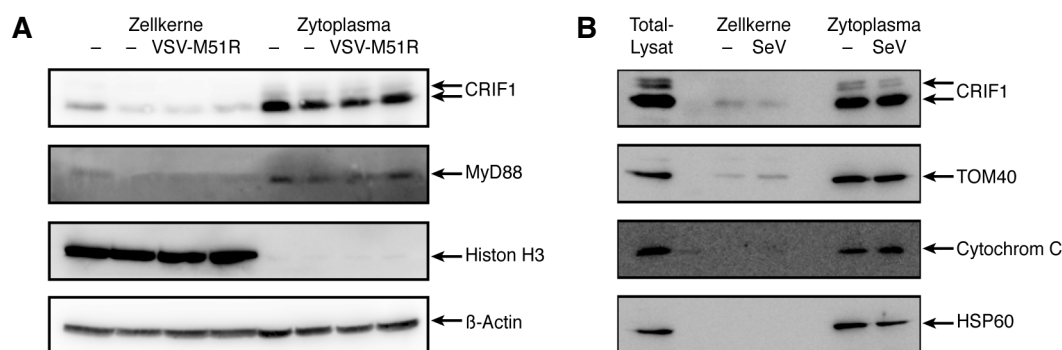


Abbildung 10: Subzelluläre Fraktionierungen von 1205lu-Zellen und MEFs

1205lu-Zellen wurden 24 h mit 5 MOI VSV M51R oder OptiMEM stimuliert und subfraktioniert in Zellkerne und Zytoplasma. Die Proben wurden mittels Western Blot und Antikörpern gegen CRIF1, MyD88, Histon H3 und β-Aktin analysiert (A). MEFs wurden 24 h mit Sendai-Virus oder OptiMEM stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde als Total-Lysat in Zell-Extraktions-Puffer lysiert. Die restlichen Zellen wurden wie in (A) in Zellkerne und Zytoplasma subfraktioniert und mittels Western Blot mit Antikörpern gegen CRIF1, TOM40, Cytochrom C und HSP60 analysiert (B).

3.4.2 Die Lokalisation von CRIF1 wird gesteuert durch eine mitochondriale targeting-Sequenz und ein nukleäres Lokalisationssignal

Sequenzanalysen von CRIF1 sagen eine MTS von 36 Aminosäuren am n'-Terminus [168] sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) von den Aminosäuren 184 bis 200 voraus (Uniprot Consortium) (Abbildung 11).



Abbildung 11: CRIF1 besitzt eine mitochondriale *targeting*-Sequenz und ein nukleäres Lokalisationssignal

Schematische Darstellung der funktionellen Domänen basierend auf der Primärstruktur von CRIF1.

Um den Einfluss dieser Domänen auf die subzelluläre Lokalisation von CRIF1 zu untersuchen, wurden Plasmide mit Venus-*tag* am c'-Terminus (CRIF1-Venus) oder am n'-Terminus (Venus-CRIF1) von CRIF1 sowie eine MTS-Deletionsmutante von CRIF1 mit c'-terminalem oder n'-terminalem Venus-*tag* (CRIF1Δ-Venus, Venus-CRIF1Δ) kloniert. Ferner wurde eine Variante von Venus-CRIF1Δ mit MTS am n'-Terminus kloniert (MTS-Venus-CRIF1Δ). Die Plasmide wurden in 1205lu-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden die Venus-Expression mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Als Marker für Mitochondrien wurde *Mitotracker Red CMXRos* und als Färbung für Zellkerne Hoechst-33342 verwendet.

CRIF1-Venus lokalisiert in Mitochondrien, während Venus-CRIF1 ausschließlich nukleär lokalisiert. CRIF1Δ lokalisiert im Zellkern und auch im Zytoplasma, unabhängig von der Position des Venus-*tags*. Ob die diffuse Zytoplasmafärbung auf eine physiologische zytoplasmatische Lokalisation von CRIF1 hindeutet oder Ausdruck einer Übersättigung der Kernimport-Maschinerie im Sinne eines Überexpressions-Artefaktes ist, muss an dieser Stelle unbeantwortet bleiben. MTS-Venus-CRIF1Δ lokalisiert wiederum ausschließlich in Mitochondrien (Abbildung 12). In Arbeiten der Gruppe wurde außerdem beobachtet, dass natives CRIF1 nach Immunfluoreszenz-Färbung ausschließlich mitochondrial und nicht im Zellkern lokalisiert ist (Stefanie Lietke, Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CRIF1 ein mitochondriales Protein ist, dessen Import ins Mitochondrium abhängig von einer n'-terminalen MTS ist. Maskierung oder Deletion der MTS führt zu einer nukleären Lokalisation von CRIF1 (Abbildung 12).

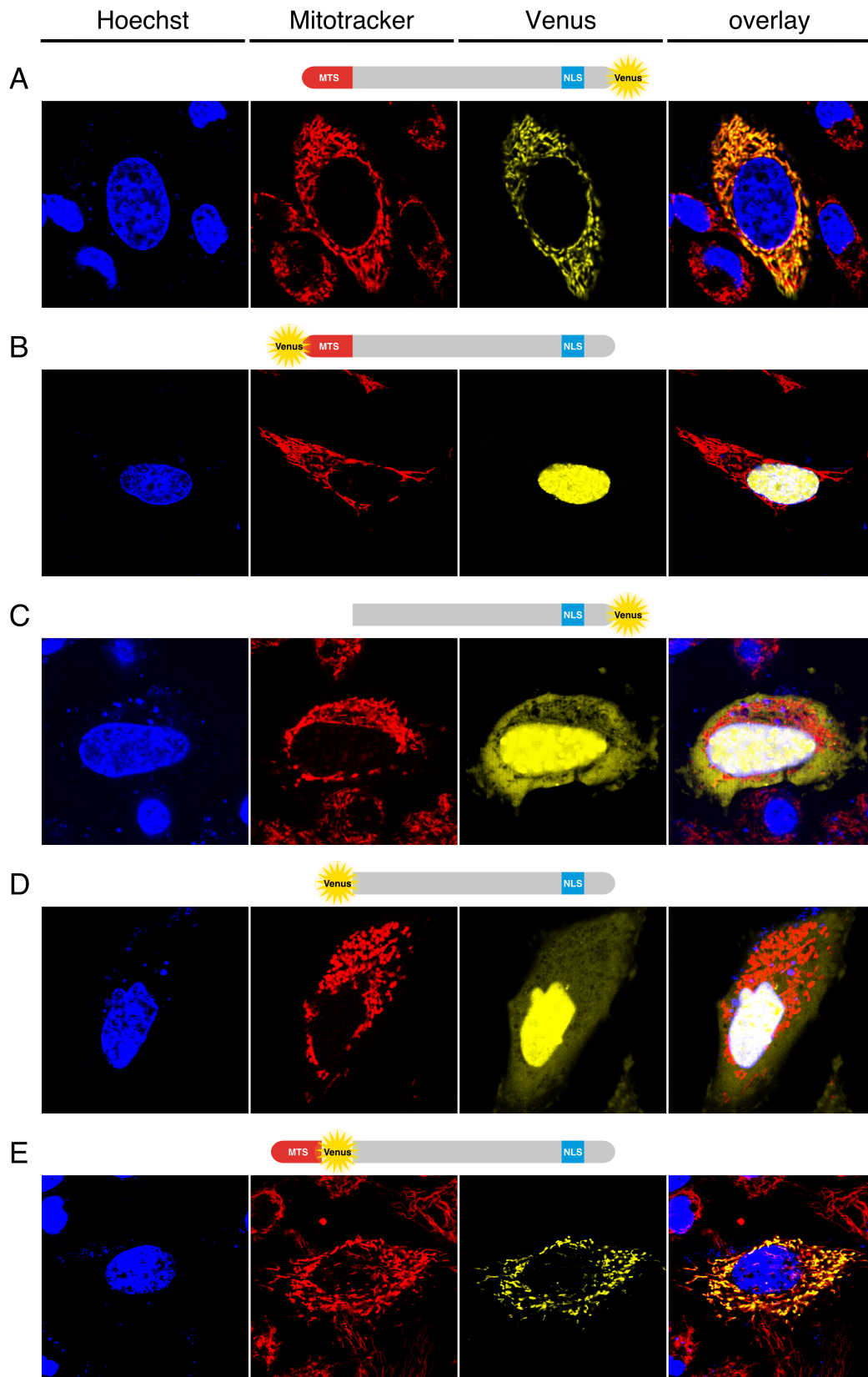


Abbildung 12: Lokalisation von CRIF1 in Abhängigkeit von der MTS und dem NLS

Je 50.000 1205lu-Zellen wurden in *CELLview glass bottom dishes* ausplattiert und mit je 0,25 μg der Plasmide CRIF1-Venus (A), Venus-CRIF1 (B), CRIF1 Δ -Venus (C), Venus-CRIF1 Δ (D) oder MTS-Venus-CRIF1 Δ (E) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 25 nM *Mitotracker Red CMXRos* und Hoechst-33342 1:20.000 gefärbt und Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop gemacht.

3.5 Eine Interaktion von CRIF1 mit Proteinen des angeborenen Immunsystems konnte nicht gezeigt werden

3.5.1 Durch Co-Immunpräzipitation kann keine Interaktion von CRIF1 mit NEMO nachgewiesen werden

Eine vermutete Interaktion zwischen CRIF1 und RIG-I konnte in Vorarbeiten der Gruppe nicht bestätigt werden (Stefanie Lietke, Daten nicht gezeigt). Eine zentrale Komponente vieler Signalwege des angeborenen Immunsystems ist NEMO oder *inhibitor of κ B kinase γ* (IKK γ): Als regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes ist es an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt sowie im Komplex mit TBK1 und IKK ϵ erforderlich für die Aktivierung von IRFs [34]. Mittels Protein-*microarrays* suchten Fenner et al. nach Interaktionspartnern von NEMO und identifizierten CRIF1 unter anderen potenziellen Kandidaten [169]. Dies führte zur Hypothese, dass CRIF1 über eine Interaktion mit NEMO einen Einfluss auf das angeborene Immunsystem ausüben könnte.

Mittels Co-IP wurde eine physikalische Interaktion zwischen CRIF1 und NEMO untersucht. In 1205lu-Zellen wurden Myc-CRIF1 und Flag-NEMO oder das Kontroll-Plasmid mCherry und Flag-NEMO überexprimiert, Zelllysate hergestellt und diese mit anti-Myc-Sepharose-*beads* inkubiert. Das ursprüngliche Zelllysat, die *beads* und der Überstand wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dabei konnte keine Co-Präzipitation von NEMO mit CRIF1 nachgewiesen werden (Abbildung 13A). Analog wurde in 1205lu-Zellen Flag-markiertes NEMO mit nativem CRIF1 oder als Kontrolle mCherry mit nativem CRIF1 überexprimiert und eine Co-IP mit anti-Flag-Sepharose-*beads* durchgeführt. *Beads*, Überstand und das Ausgangs-Zelllysat wurden wiederum mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Auch bei Immunpräzipitation von NEMO konnte keine Co-Präzipitation von CRIF1 nachgewiesen werden (Abbildung 13B).

Zusammenfassend konnte per Immunpräzipitation keine Interaktion von CRIF1 und NEMO beobachtet werden (Abbildung 13).

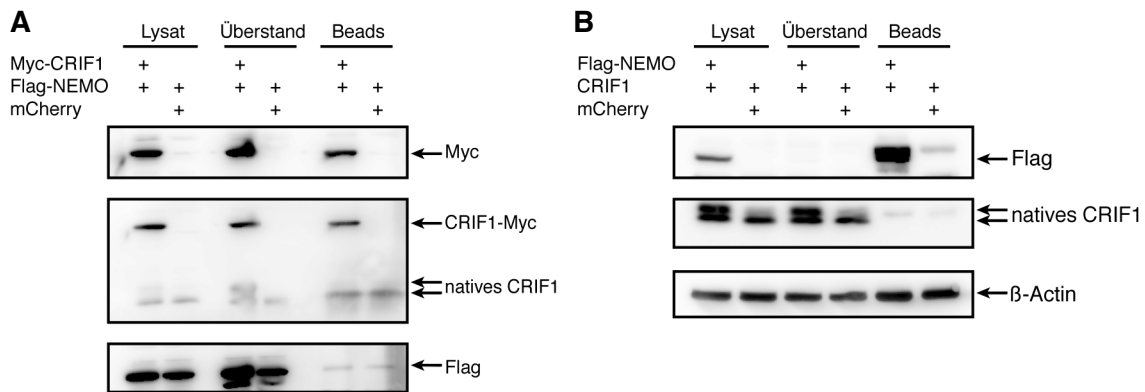


Abbildung 13: Kein Nachweis einer Interaktion von Myc-CRIF1 und Flag-NEMO mittels Co-Immunpräzipitation

Myc-CRIF1-Immunpräzipitation. 1205lu-Zellen wurden mit je 0,18 $\mu\text{g/ml}$ eines Myc-CRIF1- und eines Flag-NEMO-kodierenden Plasmids oder Plasmiden mit mCherry und Flag-NEMO transfiziert. Nach 48 h wurden Zelllysate hergestellt und über Nacht bei 4°C mit anti-Myc-Sepharose-beads inkubiert. Rohlysate, beads und Überstand wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert (**A**).

Flag-NEMO-Immunpräzipitation. 1205lu-Zellen wurden mit je 0,18 $\mu\text{g/ml}$ eines Flag-NEMO- und eines CRIF1-kodierenden Plasmids oder Plasmiden mit mCherry und CRIF1 transfiziert. Nach 48 h wurden Zelllysate hergestellt und über Nacht bei 4°C mit anti-Flag-Sepharose-beads inkubiert. Rohlysate, beads und Überstand wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert (**B**). Gezeigt ein repräsentatives von n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.5.2 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von CRIF1 mit STAT3 und NEMO

BRET ist in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu detektieren und daher eine potenziell sensitivere und spezifischere Methode als die Co-IP. Die in der Literatur vermutete Interaktion von CRIF1 mit NEMO wurde daher zusätzlich mittels BRET untersucht. Als Positivkontrolle wurde der beschriebene CRIF1-Interaktor STAT3 getestet [160]. Da die subzelluläre Lokalisation von CRIF1 von einer MTS sowie einem NLS abhängig ist (Abbildung 11, Abbildung 12), wurden sowohl Volllängen-CRIF1 als auch CRIF1 mit deletierter MTS (CRIF1 Δ) untersucht.

Volllängen-CRIF1, CRIF1 Δ , NEMO und STAT3 wurden in BRET-Vektoren mit n'- und c'-terminalem hRLuc- und Venus-tag kloniert. Ferner wurde CRIF1 Δ in BRET-Vektoren mit n'-terminalen tags und n'-terminaler MTS kloniert, welche eine mitochondriale Lokalisation von n'-terminal markiertem CRIF1 erlauben. BRET-Paare aus CRIF1 und NEMO bzw. CRIF1 und STAT3 wurden in HEK 293-Zellen exprimiert und nach 24 Stunden BRET-ratios bestimmt [167] (Abbildung 14).

Die BRET-Paare hRLuc-STAT3 – MTS-Venus-CRIF1 Δ und NEMO-hRLuc – CRIF1 Δ -Venus erreichten positive BRET-ratios. Die Paare hRLuc-CRIF1 – Venus-STAT3,

hRLuc-STAT3 – Venus-CRIF1, hRLuc-CRIF1 Δ – Venus-STAT3, hRLuc-STAT3 – Venus-CRIF1 Δ erreichten BRET-*ratios* knapp unter dem Grenzwert von 0,03 (Abbildung 14). CRIF1 ist in diesen Bedingungen im Zellkern lokalisiert und hat einen freien c'-Terminus. Unter diesen Bedingungen wurde die Interaktion von CRIF1 und STAT3 beschrieben [160].

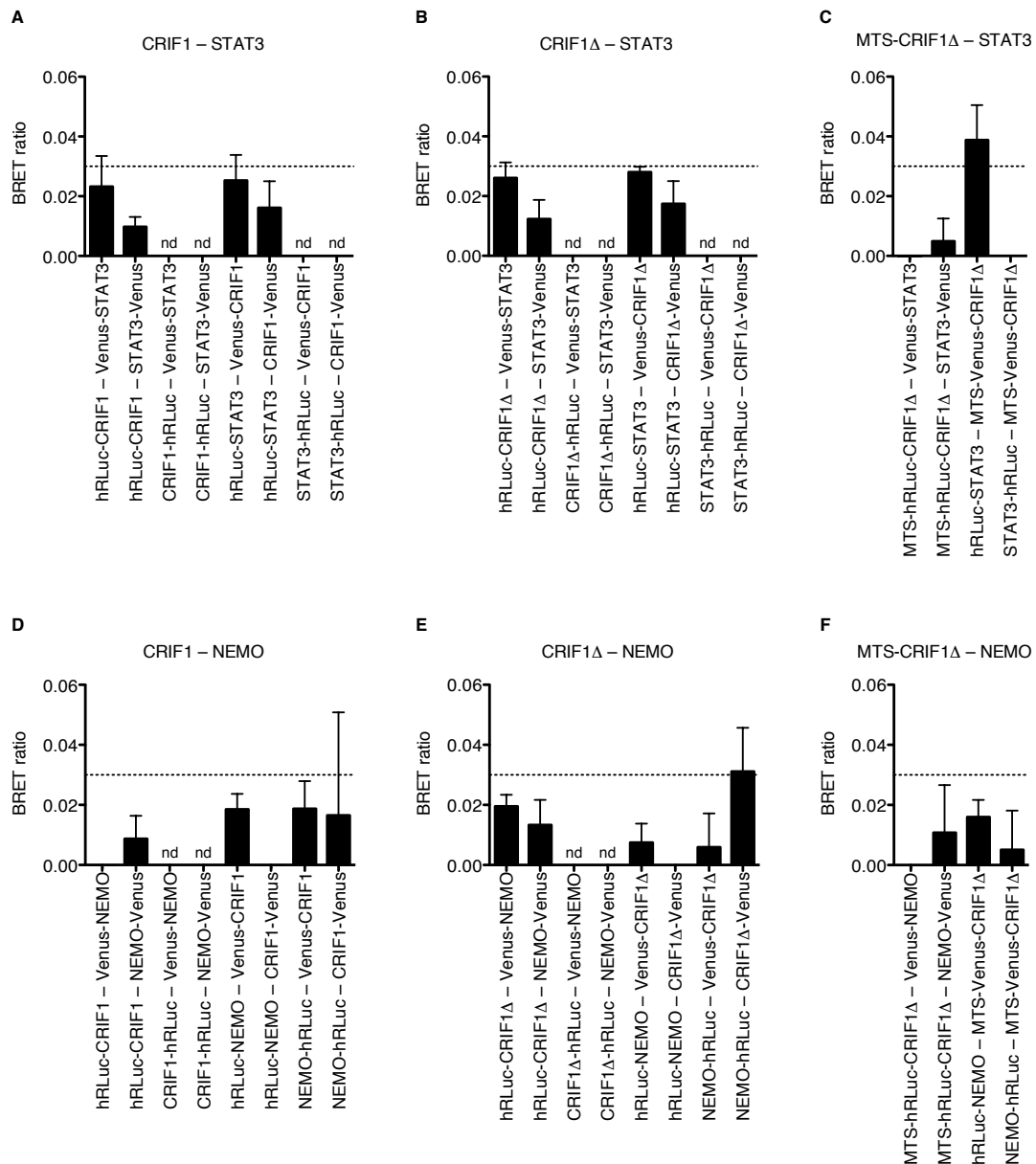


Abbildung 14: BRET von CRIF1 mit STAT3 und NEMO

Volllängen-CRIF1, CRIF1 Δ , STAT3 und NEMO wurden in BRET-Vektoren mit n'- und c'-terminalem hRLuc-*tag* (Donor) oder Venus-*tag* (Akzeptor) kloniert. CRIF1 Δ wurde ferner in BRET-Vektoren mit n'-terminaler MTS vor dem n'-terminalen *tag* kloniert. Je 0,25 μ g Donor-Konstrukt und 0,75 μ g Akzeptor-Konstrukt wurden als BRET-Paar mittels Elektroporation in HEK 293-Zellen transfiziert und nach 24 h BRET-*ratios* bestimmt. BRET *ratios* von STAT3 und CRIF1 (**A – C**). BRET *ratios* von NEMO und CRIF1 (**D – E**). Mittlere BRET-*ratios* $\geq 0,03$ wurden als positive Interaktion gewertet, Proben mit einem Luciferase-Signal ≤ 3500 wurden nicht berücksichtigt und sind als nd gekennzeichnet (gezeigt sind Mittelwerte aus n = 2 unabhängigen Screens in Duplikaten).

Mit den BRET-Paaren hRLuc-STAT3 – MTS-Venus-CRIF1 Δ , NEMO-hRLuc – CRIF1 Δ -Venus sowie hRLuc-CRIF1 – Venus-STAT3 und hRLuc-STAT3 – Venus-CRIF1 wurden Bestätigungsexperimente mit Titration des Akzeptor/Donor-Verhältnisses durchgeführt und die Daten einer Regressionsanalyse unterzogen. Bildeten die Werte eine hyperbolische Kurve mit einer Sättigung bei BRET-*ratios* größer als 0,03, wurde dies als positive Interaktion gewertet. Näherten sich die Werte einer linearen Funktion an, sprach dies gegen eine Protein-Protein-Interaktion.

Unter diesen Voraussetzungen konnte eine Interaktion zwischen STAT3 mit n'-terminalem hRLuc-*tag* und nukleär lokalisierten CRIF1 mit n'-terminalem Venus-*tag* bestätigt werden. In den anderen getesteten Bedingungen wurden die Kriterien einer positiven Interaktion nicht erfüllt (Abbildung 15).

Zusammenfassend konnte mittels BRET eine Interaktion von nukleär lokalisiertem CRIF1 mit STAT3 bestätigt werden. Eine Interaktion zwischen mitochondrial lokalisiertem CRIF1 und STAT3 oder zwischen CRIF1 und NEMO konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

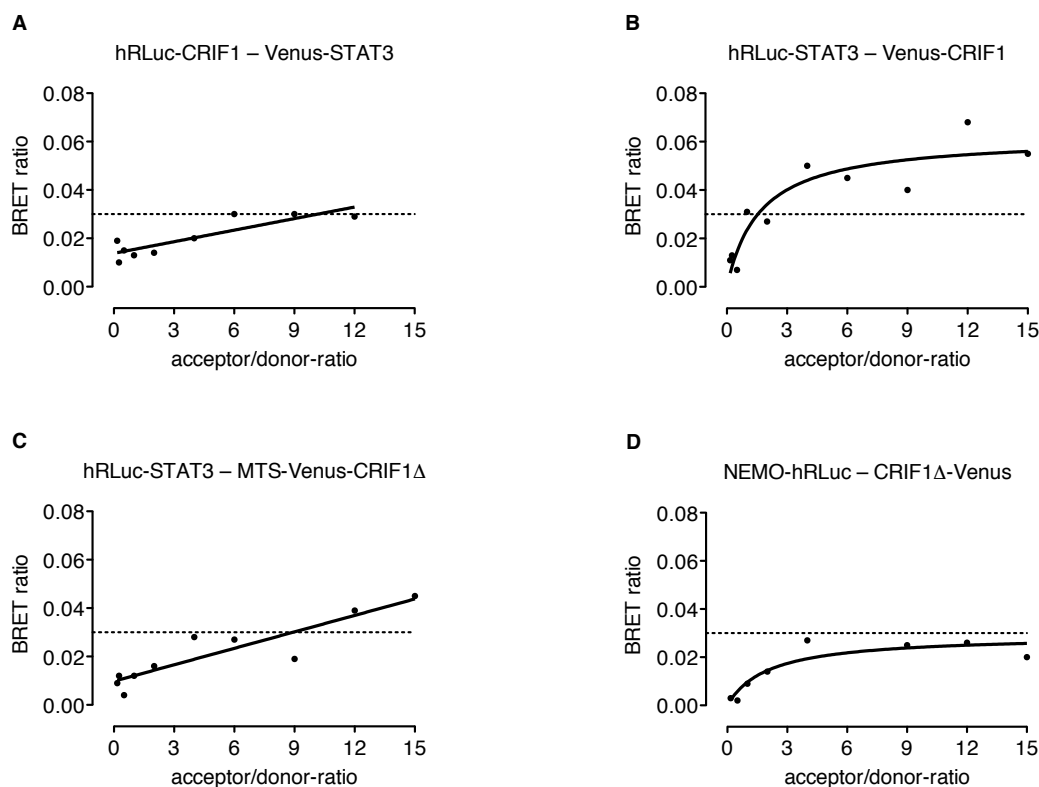


Abbildung 15: BRET Titrationsexperimente

BRET *ratios* von CRIF1 und STAT3 (**A**, **B**), CRIF1 Δ und STAT3 (**C**), CRIF1 Δ und NEMO (**D**) unter Titration des Akzeptor/Donor-Verhältnisses von 1:6 bis 15:1

3.6 CRIF1 ist essenziell für die mitochondriale Integrität und die Funktion der Atmungskette

3.6.1 Verlust von CRIF1 führt zu veränderter Mitochondrien-Morphologie

Um den Einfluss von CRIF1 auf die Integrität von Mitochondrien zu untersuchen, wurde die Zelllinie 1205lu shCRIF1-405_C2 zweimal für je 48 Stunden mit Doxycyclin oder dem gleichen Volumen PBS induziert und die Mitochondrien nach Färbung mit *Mitotracker Red CMXRos* im Konfokalmikroskop beurteilt.

Unter *knockdown* von CRIF1 zeigten sich morphologisch veränderte Mitochondrien mit Verlust der tubulären Architektur und Fragmentation der Netzwerkstruktur. Ferner wurde eine vermehrte Anreicherung des Farbstoffs im Zytoplasma beobachtet. Die Aufnahme von *Mitotracker Red CMXRos* ins Mitochondrium ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotenzial, die zytoplasmatische Anreicherung könnte also auf einen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials hindeuten (Abbildung 16).

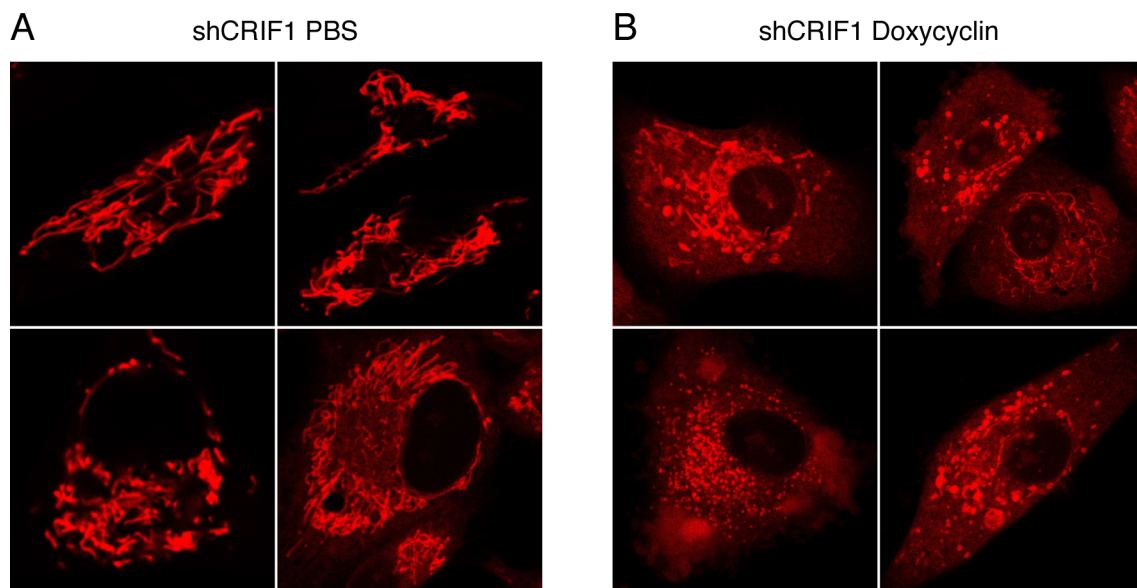


Abbildung 16: Veränderte Mitochondrien-Morphologie nach *knockdown* von CRIF1

Je 50.000 Zellen 1205lu shCRIF1-405_C2 wurden in *CELLview glass bottom dishes* ausplattiert und zweimal für je 48 h mit PBS (**A**) oder 2 μ g/ml Doxycyclin (**B**) induziert. Nach Färbung mit 25 nM *Mitotracker Red CMXRos* wurden Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop gemacht.

3.6.2 Verlust von CRIF1 führt zur Umstellung des Zellstoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse

Eine zentrale Funktion von Mitochondrien besteht in der Bereitstellung von ATP durch oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette. Einschränkungen der Mitochondrienfunktion führen zu einer Umstellung der ATP-Synthese auf aerobe Glykolyse, die mit einem schlechteren Wirkungsgrad und vermehrtem Anfall des Metaboliten Laktat erkauft wird. Wir konnten beobachten, dass *knockdown* von CRIF1 den Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot in Kulturmedium von rot zu gelb beschleunigt, was eine vermehrte Ansäuerung andeutet. Daher wurde untersucht, ob *knockdown* von CRIF1 zu einer Umstellung von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse führt.

1205lu shCRIF1-405_C2-Zellen wurden nach Protokoll mit Doxycyclin oder PBS induziert. Mit dem XFe96 Analyzer (Seahorse Bioscience) wurden über einen Zeitraum von einer Stunde insgesamt siebenmal *extracellular acidification rate* (ECAR) und *oxygen consumption rate* (OCR) im Zellkulturmedium bestimmt und die Daten gepoolt. Unter *knockdown* von CRIF1 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ECAR von 23 % sowie ein Abfall der OCR um 15 %. In parallel behandelten 1205lu Wildtyp-Zellen waren diese Effekte nicht feststellbar (Abbildung 17). Die vermehrte Säureproduktion bei gleichzeitigem Abfall des Sauerstoff-Verbrauchs deuten hin auf eine Umstellung des Zellstoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse unter *knockdown* von CRIF1.

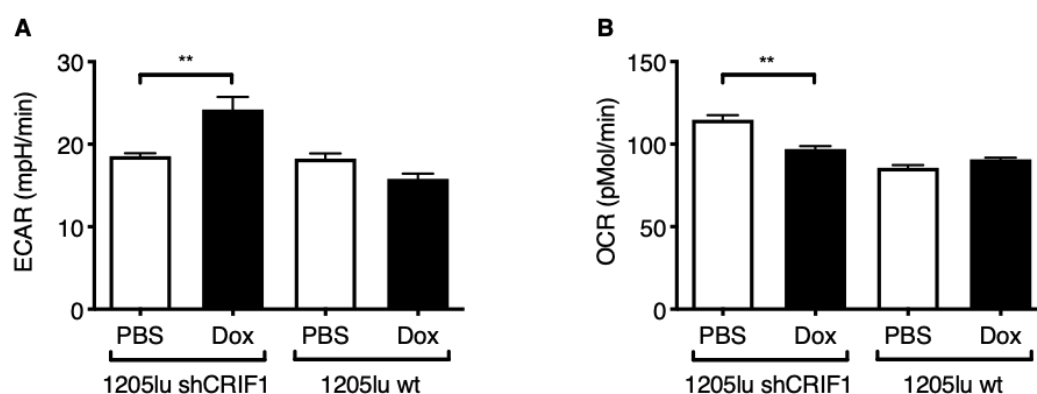


Abbildung 17: Verlust von CRIF1 steigert die basale *extracellular acidification rate* (ECAR) und reduziert die *oxygen consumption rate* (OCR)

Je 20.000 1205lu shCRIF1-Zellen und 1205lu wt-Zellen wurden zweimal für je 48 h mit 2 µg/ml Doxycyclin oder PBS induziert. Über einen Zeitraum von 1 h wurden siebenmal ECAR und OCR bestimmt und die Werte gepoolt. Gezeigt Mittelwerte ± SEM. ** $p < 0,001$.

3.6.3 Verlust von CRIF1 führt zu verminderter Expression von Komplexen der Atmungskette

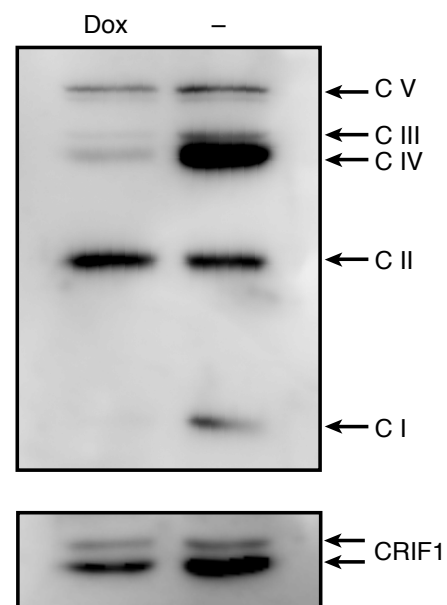
Das veränderte metabolische Profil nach *knockdown* von CRIF1 deutet hin auf eine Dysfunktion der Atmungskette mit kompensatorischer Energiegewinnung durch aerobe Glykolyse. Um die Bedeutung von CRIF1 auf die Expression von Atmungskettenkomplexen zu untersuchen, wurden MEFs mit gefloxtem CRIF1-Locus und Doxycyclin-induzierbarem Cre-Rekombinase-Konstrukt 96 Stunden mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin oder dem gleichen Volumen PBS induziert. Mittels Western Blot wurde die Expression von Untereinheiten der Komplexe I (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 β subcomplex subunit 8*, NDUFB8), II (*succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit*, SDHB), III (*ubiquinol cytochrome c reductase complex subunit 2*, UQCRC2), IV (*mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I*, MTCO1) und V (*ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1*, ATP5A1) untersucht.

Es zeigte sich nach *knockout* von CRIF1 eine verminderte Expression der Untereinheiten NDUFB8 (Komplex I), UQCRC2 (Komplex III), MTCO1 (Komplex IV) und ATP5A1 (Komplex V). Die Expression von SDHB (Komplex II) war dagegen nicht verändert (Abbildung 18). Die Komplexe I, III, IV und V besitzen allesamt mitochondrial kodierte Untereinheiten, während Komplex II ausschließlich im Zellkern kodiert ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *knockout* von CRIF1 zu einer verminderten Expression von Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V führt. Dies zeigt, dass CRIF1 erforderlich ist für die Expression von Atmungskettenkomplexen mit mitochondrial kodierten Untereinheiten.

Abbildung 18: Expression von Atmungsketten-Komplexen nach Cre/loxP-*knockout* von CRIF

CRIF1-gefloxte MEFs mit induzierbarer Cre-Rekombinase wurden für 96 h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin bzw. PBS induziert. Je 1 Mio. Zellen wurden lysiert und die Expression von Untereinheiten der Komplexe I – V mittels Western Blot untersucht. Daten repräsentativ für n = 4 unabhängige Experimente.



4 Diskussion

Trotz bedeutender Fortschritte der letzten Jahre ist die Regulation angeborener antiviraler Immunantworten und ihrer Wechselwirkungen mit dem zellulären Metabolismus nicht genau verstanden. Ein detailliertes Verständnis ihres Zusammenspiels würde neue Perspektiven auf die Pathophysiologie von Infektions-, Autoimmun-, Stoffwechsel- und Krebserkrankungen eröffnen und könnte zur Entwicklung neuer Präventionsstrategien und Therapien beitragen. Im Rahmen dieser Promotion wurde die Rolle von CRIF1 auf die angeborene antivirale Immunabwehr und den zellulären Metabolismus untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der *knockdown* von CRIF1 mittels siRNA *in vitro* zu verminderter Ausschüttung antiviraler Zytokine und zu erhöhter Virusproduktion in infizierten Zellen führt. Überexpression von CRIF1 steigerte dagegen die Ausschüttung von IP-10. In einem lentiviralen, Doxycyclin-induzierbaren shRNA-System ließen sich diese Effekte nicht bestätigen: *Knockdown* von CRIF1 zeigte keine signifikanten Effekte auf Zytokin-Ebene und führte zu stark verminderter anstatt vermehrter Virusreplikation in infizierten Zellen. Nach Stimulation mit 5'-ppp-RNA wird CRIF1 auf transkriptioneller Ebene induziert. Mittels subzellulärer Fraktionierungen und Konfokalmikroskopie wurde gezeigt, dass CRIF1 ein mitochondriales Protein ist, dessen Lokalisation von einer n'-terminalen mitochondrialen Lokalisationssequenz und einem im Normalfall maskierten nukleären Lokalisationssignal abhängig ist. Eine vermutete Interaktion von CRIF1 und NEMO konnte weder per Co-Immunpräzipitation noch per BRET nachgewiesen werden. Auch eine Interaktion von mitochondrial lokalisiertem CRIF1 mit STAT3 konnte nicht gezeigt werden. Dagegen wurde eine nukleäre Interaktion von CRIF1 und STAT3 mittels BRET bestätigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CRIF1 essenziell für die mitochondriale Integrität und die Funktion der Atmungskette ist: *Knockdown* von CRIF1 führte zum Verlust der mitochondrialen Architektur und zur Umstellung des Zellstoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse. MEFs wiesen nach Doxycyclin-induzierbarem Cre/loxP-*knockout* von CRIF1 eine verminderte Expression von Atmungskettenkomplexen mit mitochondrial kodierten Untereinheiten auf.

4.1 Methodik der CRIF1-Defizienz

Abhängig von der Methodik des *knockdowns* wurden in dieser Arbeit teils widersprüchliche Effekte von CRIF1 auf die Expression antiviraler Zytokine und auf die Virusreplikation beobachtet. Während CRIF1-siRNA in virusinfizierten Zellen die Ausschüttung antiviraler Zytokine hemmte und die Virusreplikation steigerte, hatte die Expression von

CRIF1-shRNAs in einem Doxycyclin-induzierbaren System keinen eindeutigen Einfluss auf die Zytokinproduktion und führte zu einer deutlichen Verminderung der Virusreplikation.

4.1.1 Problematik des CRIF1-Verlustes

Die funktionelle Charakterisierung eines Proteins in einer Zelle oder einem Organismus verlangt nach *loss of function*-Experimenten mit einem System, welches idealerweise eine vollständige Abwesenheit des Proteins ohne *off-target*-Effekte gewährleisten kann. Im Falle von CRIF1 besteht das Problem, dass ein Fehlen des Proteins die Zelle an einem strategischen Punkt trifft, nämlich der Energiebereitstellung durch die Atmungskette. Auf diesen gravierenden Eingriff muss die Zelle mit weitreichenden metabolischen Anpassungen zum Erhalt der energetischen Homöostase reagieren. Wie von Kim et al. [162] beschrieben und durch Experimente in unserer Gruppe bestätigt, führt ein vollständiger CRIF1-*knockout* zum Zelltod.

Für die funktionelle Charakterisierung von CRIF1 erscheint daher ein experimentelles System ideal, welches eine präzise Regulation der CRIF1-Expression erlaubt: Ein reduziertes Expressionsniveau, das die Atmungskette aufgrund ihrer funktionellen Reserven intakt lässt und beispielsweise nur die ROS-Produktion beeinflusst, würde Erkenntnisse zu Stoffwechsel-unabhängigen Funktionen von CRIF1 liefern. Eine weitere Reduktion der CRIF1-Expression, die auch die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette einschränkt, würde Analysen zum Einfluss des zellulären Metabolismus auf die Virusabwehr ermöglichen. In jedem Fall muss das System eine minimale Restexpression von CRIF1 gewährleisten, um den Zelltod zu verhindern.

Das in vielen experimentellen Ansätzen verwendete und in der Literatur gut beschriebene und etablierte *Tet-on* System stellte sich aufgrund des vollständigen CRIF1-*knockouts* für unsere Fragestellung als problematisch und in der Interpretation schwierig heraus. siRNAs und shRNAs erlauben zwar eine minimale Restexpression des Proteins, eine genauere Regulation der Genexpression ist jedoch nicht möglich. Ob die in dieser Arbeit beobachteten Effekte der CRIF1-Defizienz auf den Verlauf einer Virusinfektion eine spezifisch antivirale und Metabolismus-unabhängige Funktion abbilden, oder vielmehr Auswirkungen der metabolischen Umstellung oder gar der in den Zelltod mündenden zellulären Stressreaktion sind, ist daher nicht eindeutig abzugrenzen.

4.1.2 RNA-Interferenz als experimentelles System

RNAi ist ein etabliertes System zur funktionellen Untersuchung von Genen, das dennoch das Risiko von *off-target*-Effekten birgt. Ein Problem ist die Spezifität des *knockdowns*: siRNAs und shRNAs werden perfekt komplementär zu einer Ziel-mRNA entworfen und die *knockdown*-Effektivität bezogen auf dieses Gen validiert. Durch partielle Komplementarität zu den 3'-UTRs anderer mRNAs können siRNAs – ähnlich miRNAs – jedoch noch eine Vielzahl weiterer Gene regulieren [170-172]. Als zellfremde Nukleinsäuren können siRNAs ferner durch Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität erkannt werden: PKR, TLR3, TLR7, TLR8 und RIG-I können Sequenz-abhängig und Sequenz-unabhängig durch siRNA aktiviert werden [173-176]. In unseren Experimenten konnten wir auf Zytokinebene keine Interferon-Induktion durch die verwendeten siRNAs und shRNAs beobachten, eine Beeinflussung von Signalwegen der angeborenen Immunität kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund ihrer Kürze werden shRNAs meist unter die Kontrolle starker Promotoren gestellt, in dieser Arbeit des U6-Promotors. Es wurde beschrieben, dass ein Überschuss an siRNAs oder shRNAs zu einer Übersättigung des RNAi-Signalwegs führen und so die Genregulation durch endogene miRNAs weitreichend beeinträchtigen kann [177, 178].

4.1.3 Doxycyclin-induzierbare Genregulation

Anlass für die Etablierung des shRNA-Systems in dieser Arbeit war die Beobachtung einer erheblichen Toxizität der für die Transfektion der siRNAs eingesetzten liposomalen Reagenzien und eine limitierte Transfektionseffizienz der siRNA-behandelten Zelllinien. Da ein stabiler kompletter CRIF1-*knockout* zytotoxisch ist oder zumindest proliferationshemmend wirkt (siehe 4.1.1), schien ein stabil integriertes, Doxycyclin-induzierbares shRNA-System eine ideale methodische Lösung für diese Schwierigkeiten.

Das für die shRNA-Induktion verwendete Antibiotikum Doxycyclin aus der Klasse der Tetracycline hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese durch Blockade der Aminoacyl-tRNA-Bindestelle an der 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Durch die phylogenetische Verwandtschaft von Mitochondrien und Bakterien wurde eine toxische Wirkung von Doxycyclin auch auf die humane mitochondriale Proteinbiosynthese beschrieben [179] und dies kürzlich auch für die Anwendung des *Tet-on* Systems als potenzielles Problem hervorgehoben [180]. Damit kann Doxycyclin in ähnlicher, wenn auch nicht gleicher Weise wie die Defizienz von CRIF1 die humane mitochondriale Translation hemmen und macht für unsere Fragestellung die Unterscheidung von Doxycyclin- und CRIF1-vermitteltem Effekt problematisch (Abbildung 8).

Des Weiteren wurde kürzlich ein direkt inhibitorischer Effekt von Doxycyclin auf die Replikation von VSV beschrieben, der auch in unseren Experimenten sichtbar ist (Abbildung 9) [181]. Bei stark gehemmter Virusreplikation kommt dann potenziell zum Tragen, dass weniger Liganden für die RIG-I-Aktivierung produziert werden können und damit zunächst unabhängig von der Menge an CRIF1 weniger Interferon-induzierte Gene wie IP-10 exprimiert werden.

Eine funktionelle Beeinflussung des oxidativen Stoffwechsels durch Doxycyclin alleine wurde in den verwendeten Konzentrationen anhand der Messung von ECAR und OCR hier zwar nicht beobachtet (Abbildung 17). Dennoch besteht im Doxycyclin-induzierten System die Möglichkeit einer gegenseitigen Beeinflussung von CRIF1-Defizienz und Doxycyclin-Wirkung auf die mitochondriale Translation und damit die Balance der Atmungskettenkomplexe, das Membranpotential und die Produktion von ROS. Widersprüche zwischen den Experimenten mit induzierter shRNA und siRNA lassen sich also über den direkt hemmenden Effekt von Doxycyclin auf Virusreplikation und die mitochondriale Translation erklären und es ist zu erwarten, dass die Effekte im siRNA-vermittelten CRIF1-*knockdown*-System korrekter die Effekte einer CRIF1-Defizienz widerspiegeln.

4.2 Zelluläre Lokalisation und Interaktionspartner von CRIF1

4.2.1 CRIF1 als mitochondriales Protein

In dieser Arbeit wird CRIF1 als ein mitochondrial lokalisiertes Protein charakterisiert. Nur nach Deletion oder Maskierung der MTS kann eine Lokalisation von CRIF1 im Zellkern beobachtet werden.

Frühe Arbeiten hingegen beschrieben CRIF1 als ausschließlich nukleär lokalisiertes Protein: Gornemann et al., die das spätere CRIF1 noch als PLINP benannten, verwendeten für ihre *pulldown*- und Lokalisations-Experimente CRIF1-Konstrukte mit n'-terminalem Glutathion-(S)-Transferase-(GST)-tag (pGEX-4T2) bzw. n'-terminalem EGFP-tag (pEGFP-C3) [156]. Chung et al. charakterisierten CRIF1 als nukleär lokalisierten Interaktor von GADD45-Proteinen mit hemmender Wirkung auf die Zellzyklusprogression. Sie untersuchten in ihren *pulldown*-Experimenten (pCMV-Tag2 und pCMV-Tag3), *mammalian two-hybrid assays* (pCMV-BD und pCMV-AD), Überexpressions- (pCMV-Tag2) und Lokalisations-Experimenten (pCMV-Tag3) jedoch ebenfalls ausschließlich n'-terminal markiertes CRIF1 [157]. Die gleichen CRIF1-Konstrukte wurden verwendet von

Park et al. und Suh et al., welche CRIF1 als Inhibitor des nukleären Rezeptors Nur77 und als nukleären Repressor des Androgen-Rezeptors in Prostata-Zellen charakterisierten [158, 182]. Oh et al. zeigten, dass eine Phosphorylierung von CRIF1 an Ser221 durch die Casein-Kinase CKII die Zellproliferation steigert. Sie verwendeten für *yeast two-hybrid assays* (pGADGH), *in-vitro pulldown assays* (pET14b) und Überexpressions-Experimente (pCMV2B) jedoch ebenfalls CRIF1-Vektoren mit n'-terminalen *tags* [183]. Auch die Arbeit von Kwon et al., welche CRIF1 als nukleären transkriptionellen Koaktivator von STAT3 beschrieb, verwendet für Co-IPs, Kolokalisations- und Überexpressions-Experimente ausschließlich CRIF1-Konstrukte mit n'-terminalen Myc- oder HA-*tags* [160]. Kwon et al. generierten erstmals Mäuse mit gewebespezifischem CRIF1-*knockout* in intestinalen Epithelzellen und beobachteten eine massive Entwicklungsstörung des Darms, die perinatal zum Tod der Mäuse führte. Mechanistisch zeigten die Autoren – unter Verwendung von Plasmiden mit n'-terminalem HA-*tag* für Co-IP-, Lokalisations- und Überexpressions-Experimente – dass CRIF1 für die Koaktivierung des für die Enterozyten-Differenzierung essenziellen Transkriptionsfaktors *E74-like factor 3* (ELF3) benötigt wird [184]. In der Arbeit von Kang et al., die CRIF1 eine Rolle in der Ubiquitinierung und dem Proteasom-vermittelten Abbau des antioxidativen Transkriptionsfaktors NRF2 zuschrieb, wurden Co-IP- und Überexpressions-Experimente ebenfalls mit n'-terminal markierten CRIF1-Plasmiden durchgeführt [185].

Nach den Ergebnissen unserer Experimente müssten sämtliche der in diesen Arbeiten verwendeten CRIF1-Konstrukte durch Maskierung der n'-terminalen MTS zu einer unphysiologischen Fehllokalisierung von CRIF1 im Zellkern führen. Ob zelluläre Mechanismen existieren, die die Translokation von CRIF1 ins Mitochondrium verhindern und so unter bestimmten Umständen tatsächlich eine physiologische nukleäre Lokalisation ermöglichen, beispielsweise durch posttranslationale Modifikation der MTS, ist bislang nicht untersucht. Nach aktuellem Kenntnisstand muss jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei manchen der beobachteten Effekte von CRIF1 im Zellkern um experimentelle Artefakte handeln könnte. Interessanterweise wurden in der o.g. Studie von Oh et al. zur Phosphorylierung von CRIF1 durch CKII die Co-IP-Experimente mit c'-terminal markiertem (pcDNA3.1/Myc-His) und demzufolge mitochondrial lokalisiertem CRIF1 durchgeführt [183]. Tatsächlich ist für CKII auch eine wichtige Funktion im mitochondrialen Protein-Import beschrieben [186, 187].

Im Laufe der hier beschriebenen experimentellen Arbeiten erschienen eine Reihe von Publikationen, welche die Lokalisation von CRIF1 im Mitochondrium bestätigten. So charakterisierten Kim et al. und Koc et al. CRIF1 als Bestandteil der großen 39S-Untereinheit

des Mitochondriums. Die Gruppen konnten zeigen, dass CRIF1 mit mitochondrialen Chaperonen wie *tumorous imaginal disc 1* (TID1) interagiert und essenziell ist für die Translocation von OXPHOS-Komplexen und für deren Integration in die innere Mitochondrienmembran. Ein konditionaler *knockout* von CRIF1 mittels retroviraler Cre-Rekombinase in geflochtenen MEFs führt zum Verlust von OXPHOS-Untereinheiten mit konsekutiver Dysfunktion der Atmungskette und Umstellung des Metabolismus von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse. Des Weiteren führt der *knockout* zur Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials und zu vermehrter ROS-Produktion [162, 188, 189]. Ohne die mitochondriale Funktion von CRIF1 zu kennen, beschrieben bereits Kwon et al., dass CRIF1-defiziente Mäuse embryonal letal sind [160]. Auch unsere Gruppe konnte beobachten, dass *Tet-on* Cre-vermittelter CRIF1-*knockout* innerhalb weniger Tage zum Zelltod führt. Durch siRNA- oder shRNA-Expression vermittelter *knockdown* von CRIF1 hatte dagegen – vermutlich aufgrund einer minimalen CRIF1-Restexpression – keine verminderte Zellviabilität zur Folge.

4.2.2 Postulierte Interaktion von CRIF1 mit NEMO und STAT3

Auf Grundlage der Arbeit von Fenner et al., die mittels Protein-*microarrays* CRIF1 als potenziellen Interaktionspartner von NEMO identifizierten, postulierten wir eine Rolle von CRIF1 im angeborenen Immunsystem über eine Interaktion mit NEMO [169]. Leider konnte weder mittels Co-IP, noch mittels BRET eine solche Interaktion bestätigt werden. Die Positivkontrolle bekannter NEMO-Interaktoren wie IKK α und IKK β , GST-*pulldown*- und Co-IP-Bestätigungsexperimente mit neu identifizierten Interaktoren sowie deren funktionelle Testung sprechen für eine hohe Validität des Screening-Ansatzes von Fenner et al. [169]. Dennoch handelt es sich um eine *in-vitro*-Methode, welche die zelluläre Kompartimentierung von Proteinen nicht berücksichtigen kann. NEMO ist ein zytoplasmatisches Protein und kann bei Überexpression mit n'- oder c'-terminalem Venus-*tag* eindeutig nicht in Mitochondrien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Wir konnten lediglich für CRIF1-Konstrukte mit deletierter MTS (CRIF1 Δ) eine diffuse Plasmaanreicherung beobachten, welche wir als Überexpressions-Artefakt werten. Unter dieser Annahme befinden sich CRIF1 und NEMO physiologisch nicht im gleichen Zellkompartiment, was eine Interaktion der Proteine unwahrscheinlich macht.

CRIF1 wurde beschrieben als essenzieller Koaktivator von STAT3 [160]. Die Autoren beobachteten ferner, dass CRIF1^{-/-}-Mäuse am embryonalen Tag 6,5 starben und schwere Entwicklungsdefekte mit gestörter Proliferation und massiver Apoptose aufwiesen. Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen an STAT3^{-/-}-Mäusen, die ebenfalls am

embryonalen Tag 6,5 bis 7,5 sterben [190], sodass Kwon et al. den embryonalen Tod von CRIF1^{-/-}-Mäusen mit einer Dysfunktion des STAT3-Signalwegs begründeten. Zum Zeitpunkt der Publikation war allerdings die mitochondriale Funktion von CRIF1 als Komponente der Atmungskette noch nicht bekannt, zudem erschien in der Folge eine Arbeit, die STAT3 als mitochondriales Protein beschrieb: Wegrzyn et al. konnten zeigen, dass STAT3 abhängig von seiner Lokalisation im Mitochondrium und unabhängig von seiner Rolle als Transkriptionsfaktor die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette steigert [191]. Tammineni et al. konnten bestätigen, dass STAT3 mittels *gene associated with retinoid-Interferon induced cell mortality 19* (GRIM19) ins Mitochondrium importiert wird und an der inneren Mitochondrienmembran mit Komplex I kolokalisiert [192]. Mechanistisch ist die metabolische Funktion von STAT3 bisher wenig verstanden, eine Interaktion mit CRIF1 in Mitochondrien wäre hierfür eine mögliche Erklärung. In unseren BRET-Experimenten konnte eine Interaktion von mitochondrial lokalisiertem CRIF1 mit STAT3 jedoch nicht nachgewiesen werden. Die vorbeschriebene Interaktion von nukleär lokalisiertem CRIF1 mit STAT3 konnte dagegen bestätigt werden.

4.3 CRIF1 als Regulator von Metabolismus, ROS-Homöostase und Zellzyklus

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Verlust von CRIF1 zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Architektur und zu verminderter Expression von Komplexen der Atmungskette mit Umstellung des Zellmetabolismus von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse führt. Ein Einfluss von CRIF1 auf die ROS-Produktion wurde bereits in einigen Arbeiten adressiert, die bisherigen Daten in der Literatur ergeben hierzu jedoch kein eindeutiges Bild:

Kang et al. beschrieben, dass CRIF1 die Stabilität des antioxidativen Transkriptionsfaktors NRF2 durch Förderung von dessen Ubiquitinierung und Proteasom-vermitteltem Abbau reguliert und dadurch die Expression antioxidativer Zielgene hemmt mit der Folge eines erhöhten zellulären ROS-Niveaus. CRIF1-überexprimierende Zellen akkumulieren nach Behandlung mit H₂O₂ vermehrt ROS – unter dem Vorbehalt, dass hier n'-terminal markierte CRIF1-Konstrukte verwendet wurden, wie oben beschrieben –, während CRIF1-*knockdown* mittels siRNA zu verminderter ROS-Akkumulation führt [185].

Kim et al. und Ryu et al. beobachteten dagegen erhöhte mitochondriale ROS-Levels *in vitro* nach CRIF1-*knockout* in MEFs und *in vivo* in Mäusen mit Adipozyten-spezifischem CRIF1-*knockout* [162, 193]. Nagar et al. beobachteten eine vermehrte Produktion

mitochondrialer ROS in CRIF1-defizienten Endothelzellen [194, 195] und postulieren hierfür eine Beteiligung des Redox-Enzyms p66shc [196].

Vermutlich lässt sich der Effekt von CRIF1 auf den zellulären Redox-Status mit einfachen *loss of function*- oder Überexpressions-Experimenten nicht ausreichend abbilden. Die mitochondriale Atmungskette unterliegt einem sensiblen elektrochemischen Fließ-Gleichgewicht, in dem kleine Manipulationen je nach biologischem Kontext unterschiedliche Auswirkungen haben können. Möglicherweise liegen die scheinbar gegensätzlichen Beobachtungen in den unterschiedlichen experimentellen Systemen begründet: Alle Arbeiten, die ein reduziertes ROS-Niveau nach CRIF1-Verlust beschreiben, wurden mit siRNAs durchgeführt, die immer eine geringe Restexpression des Proteins erlauben. Die Beobachtung erhöhter ROS-Levels in Abwesenheit von CRIF1 wurde dagegen überwiegend in *knockout*-Modellen gemacht, die zu einem kompletten Verlust des Proteins führen.

Frühe Arbeiten charakterisierten CRIF1 als nukleär lokalisierten Tumorsuppressor, der als Cofaktor von GADD45-Proteinen und als Inhibitor von Nur77 und CDK2 den G1/S-Übergang des Zellzyklus hemmt [157-159], sowie durch Repression des Androgen-Rezeptors die Expression von Androgen-Zielgenen und die Proliferation von Prostatakarzinomzellen hemmt [182, 197]. Im Komplex mit dem Chromatin-remodeller *sucrose non-fermenting 5* (SNF5) kann CRIF1 in die Promotor-Region des p53-Gens rekrutiert werden, wo es die Expression des Tumorsuppressors p53 und seiner Zielgene steigert [198]. In papillären Schilddrüsenkarzinomen und Brustkrebs wurde eine reduzierte CRIF1-Expression gezeigt, bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom eine positive Korrelation zwischen CRIF1-Expression im Tumor und Überleben [157, 199]. Transkriptionelle Repression von CRIF1 durch *nucleus accumbens 1* (NAC-1) ist wiederum assoziiert mit Tumorprogression von Ovarialkarzinomen, die Autoren begründen diesen Effekt mit der Aufhebung einer Zellzyklusblockade durch Inaktivierung des GADD45-Signalwegs [200, 201]. Als Cofaktor des onkogenen Transkriptionsfaktors STAT3 wurde CRIF1 andererseits auch eine pro-proliferative Wirkung zugeschrieben [160]. Wie oben dargelegt, ist die Relevanz von Funktionszuschreibungen von CRIF, die auf nukleärer Lokalisation des Proteins beruhen, jedoch unklar.

In Kenntnis der mitochondrialen Funktion von CRIF1 ist eine Beeinflussung des Zellzyklus durch CRIF1 via metabolische oder Redox-abhängige Mechanismen wahrscheinlicher: Otto Warburg beschrieb bereits 1930, dass Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen bevorzugt Energie aus der Glykolyse unter Produktion von Laktat gewinnen [202, 203]. Diese metabolische Umstellung gilt noch heute als ein wesentliches

Kennzeichen der Karzinogenese [204]. Vahedi et al. postulieren eine Rolle von CRIF1 in der Regulation des Warburg-Effekts in Leukämiezellen: Sie konnten zeigen, dass das Protein *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LCK) die Interaktion zwischen CRIF1 und dem Chaperon TID1 blockiert, wodurch die Expression von OXPHOS-Komplexen gehemmt und die Umstellung von oxidativem Stoffwechsel zu aerober Glykolyse gefördert wird [205, 206]. Auch der pro-proliferative Effekt einer Repression von CRIF1 durch NAC-1, der von Nakayama et al. und Jinawath et al. mit einer Inaktivierung des GADD45-Signalwegs begründet wurde, könnte nach heutigem Verständnis eher der Effekt einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und einer Beeinflussung des zellulären Redox-Status sein [200, 201].

4.4 CRIF1 als Regulator von Immunantworten

4.4.1 Interaktionen von Metabolismus und Immunsystem

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass ein infektiöser Stimulus funktionelle Anpassungen in Zellen des angeborenen Immunsystems erzeugt, die zu einer verstärkten Immunantwort auf eine zweite Infektion führen; hierfür wurde der Begriff *trained immunity* geprägt [207]. Mechanistisch werden für dieses Training unter Anderem metabolische Anpassungen im Sinne des Warburg-Effektes verantwortlich gemacht [208]: Stimulation von Mäusen mit β -Glucan führt über Aktivierung des Akt-mTOR-HIF-1 α -Signalwegs in Monozyten zu einer Steigerung der aeroben Glykolyse und Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, in der Folge sind die Mäuse vor einer *S. aureus*-Sepsis geschützt [209]. Nach Stimulation mit LPS stellen Makrophagen ihren Metabolismus ebenfalls über den mTOR-HIF-1 α -Signalweg auf aerobe Glykolyse um und produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6; dieser Phänotyp wird als M1-Makrophagen bezeichnet. Alternativ differenzierte, antiinflammatorische M2-Makrophagen zeichnen sich dagegen durch eine STAT6- und *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ)-dominierte Gensignatur mit gesteigertem oxidativen Metabolismus und Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 aus [210, 211]. Auch Stimulation von dendritischen Zellen mit Typ-1-Interferonen führt zu einer HIF-1 α -abhängigen metabolischen Umstellung von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse nach Stimulation mit poly(I:C) [212].

Eng mit der Funktionalität der Atmungskette gekoppelt ist der Metabolismus mitochondrialer ROS, die als wichtige Signalmoleküle fungieren. Während Virusinfektionen

beeinflussen sie die RLR-Signaltransduktion und IRF3-abhängige Genexpression sowie die Expression von MAVS und Interferon-stimulierten Genen [108-111]. Die Bedeutung mitochondrialer ROS im Rahmen angeborener Immunreaktionen wurde detailliert im Einleitungskapitel dieser Arbeit dargelegt [99, 101-110, 213, 214]. Der genaue Mechanismus der ROS-Induktion im Rahmen von Immunantworten ist jedoch nicht bekannt.

4.4.2 CRIF1 als Bindeglied zwischen Metabolismus und Immunsystem

Seine Schlüsselposition im oxidativen Stoffwechsel macht CRIF1 zu einem potenziellen Regulator des Immunsystems. Jung et al. untersuchten die Funktion von CRIF1 in Makrophagen: Mäuse mit Knochenmark-spezifischem CRIF1-*knockout* weisen eine reduzierte oxidative Kapazität sowie – unabhängig von einer Stimulation mit IFN- γ und LPS – einen proinflammatorischen, M1-prädominanten Makrophagen-Phänotyp mit gesteigerter IL-6-Induktion und p38-Phosphorylierung auf. Für diese Beobachtung besteht ein Gendosis-Effekt zwischen heterozygotem und homozygotem CRIF1-*knockout*. Phänotypisch entwickeln die Mäuse interessanterweise eine Insulinresistenz und Inflammation des Fettgewebes. Mittels IL-4-abhängiger STAT6-Aktivierung oder durch den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon kann in CRIF1-*knockout*-Makrophagen ein M2-Phänotyp induziert werden. Die Autoren schlussfolgern, dass der oxidative Metabolismus in Makrophagen CRIF1-abhängig deren Polarisierung zugunsten eines antiinflammatorischen M2-Phänotyps steuert und so Inflammation und Insulinresistenz im Fettgewebe reguliert [215].

In Adipozyten führt ein homozygoter CRIF1-*knockout* zu erheblicher Entwicklungsstörung und einem frühzeitigen Tod, Mäuse mit heterozygoter CRIF1-Defizienz in Adipozyten entwickeln sich dagegen normal. Sie weisen dennoch eine reduzierte oxidative Kapazität auf, entwickeln eine Insulinresistenz und zeigen eine Akkumulation von Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen im Fettgewebe sowie ein proinflammatorisches Zytokinprofil wie beim metabolischen Syndrom. *In vitro* lässt sich die Produktion inflammatorischer Zytokine durch das Antioxidans NAC oder einen p38-MAPK-Inhibitor unterbinden. Die Autoren postulierten daher, dass ein CRIF1-Mangel in Adipozyten durch beeinträchtigte OXPHOS-Kapazität und gesteigerte ROS-Produktion zur chemotaktischen Rekrutierung von Makrophagen ins Fettgewebe mit konsekutiver Inflammation und Insulinresistenz führt [193].

Ein Endothelzell-spezifischer CRIF1-*knockout* führt *in vivo* und *in vitro* durch eingeschränkte OXPHOS-Kapazität und oxidativen Stress zu einer Herunterregulation des Proteins SIRT1, einem Mitglied der Sirtuin-Familie, die zelluläre Stressantworten,

Metabolismus und genomische Integrität regulieren [216]. In der Folge werden über Aktivierung von NF- κ B vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α ausgeschüttet, durch Acetylierung der endothelialen NO-Synthase vermindert vasodilatorisches NO produziert sowie *in vitro* die Adhäsion zwischen Monozyten und Endothelzellen durch vermehrte Expression von *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) gesteigert [195, 217].

Wie oben dargelegt, wird in der Literatur nach siRNA-vermitteltem *knockdown* ein erniedrigtes ROS-Niveau, nach *knockout* von CRIF1 dagegen ein erhöhtes ROS-Niveau sowie eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials beschrieben. Für die Funktionalität des RLR-Signalwegs ist nach aktuellem Verständnis dagegen ein intaktes mitochondriales Membranpotenzial unentbehrlich [28]. Die abgeschwächte Interferon-Antwort und vermehrte Virusreplikation nach siRNA-*knockdown* in unseren Experimenten werten wir daher als Folge einer reduzierten RLR-Signaltransduktion durch eine verminderte ROS-Produktion an der Atmungskette und ein beeinträchtigtes mitochondriales Membranpotenzial. Die reduzierte antivirale Interferon-Antwort erlaubt dann eine vermehrte virale Replikation.

4.4.3 CRIF1-Defizienz als Krankheitsmodell

Mitochondriale Dysfunktion mit Defekten der Atmungskette und gestörter ROS-Produktion ist beteiligt an der Pathophysiologie zahlreicher metabolischer und degenerativer Erkrankungen, wie Typ-2-Diabetes [218], nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung [219], kardiovaskulären [220] und neurodegenerativen Erkrankungen [221], sowie den Prozessen des Alterns [222]. Dieser Zusammenhang konnte in einigen Tiermodellen mit gewebespezifischem CRIF1-*knockout* reproduziert werden: Die Arbeiten an Mäusen mit Endothelzell-spezifischem CRIF1-*knockout* zur Rolle der Mitochondrien bei kardiovaskulären Krankheiten wurden oben beschrieben [194, 195, 217]. Mäuse mit CRIF1-*knockout* in Kardiomyozyten weisen phänotypisch eine hypertrophe Kardiomyopathie auf [223] und ein Neuronen-spezifischer CRIF1-*knockout* hat in Mäusen eine ab Woche 12 einsetzende, progrediente Neurodegeneration zur Folge [162]. Mäuse mit Adipozyten- und Makrophagen-spezifischem CRIF1-*knockout* lieferten wichtige Erkenntnisse über die Rolle des oxidativen Stoffwechsels von Adipozyten und Makrophagen in der Regulation von Insulinresistenz und Inflammation beim metabolischen Syndrom [193, 215]. Weitere Tiermodelle mit gewebespezifischem CRIF1-*knockout* sind denkbar für die Erforschung weit verbreiteter metabolischer und inflammatorischer Erkrankungen.

4.5 Modell für die Funktion von CRIF1 im angeborenen Immunsystem gegen Virusinfektionen

Aus den vorliegenden Daten leiten wir die Hypothese ab, dass Mustererkennung des angeborenen antiviralen Immunsystems in virusinfizierten Zellen eine intakte mitochondriale ROS-Produktion und ein intaktes mitochondriales Membranpotential erfordert für eine funktionierende RLR-Signaltransduktion, IRF3-abhängige Genexpression und die Expression von Interferon-stimulierten Genen. Durch die gesteigerte Expression von CRIF1 im Rahmen einer viralen Infektion oder Stimulation mit 5'-ppp-RNA und dadurch bedingtem vermehrten Einbau von OXPHOS-Komplexen in die mitochondriale Membran wird die antivirale zelluläre Antwort im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über erhöhte Kapazität zur ROS-Produktion gesteigert (Abbildung 19).

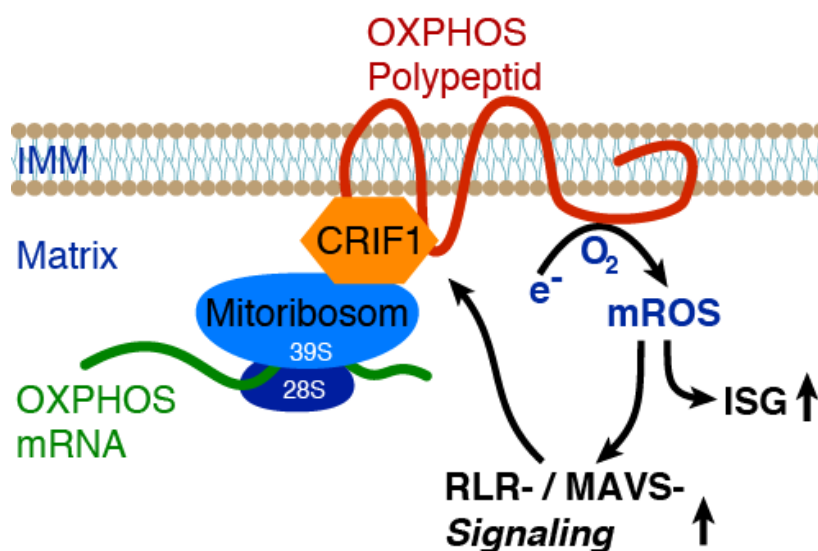


Abbildung 19: Modell für die Rolle von CRIF1 in der angeborenen antiviralen Immunität

IMM innere Mitochondrienmembran, mROS mitochondriale ROS

5 Zusammenfassung

Die Abwehr einer Virusinfektion durch das angeborene Immunsystem ist das Ergebnis komplexer Interaktionen zwischen Wirt und Erreger. Mitochondrien kommt hierbei eine zentrale Bedeutung als Plattformen der Signaltransduktion und als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies zu. Die RIG-I-like Helikasen (RLR) mit ihrem mitochondrial lokalisierten Adapter *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS) spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Erkennung von viraler RNA im Zytoplasma. Auf der Suche nach neuen Modulatoren dieses Signalwegs wurde in einem Co-IP-Experiment mit RIG-I *cytokine-responsive 6-interacting factor 1* (CRIF1) als potenzieller Interaktionspartner von RIG-I identifiziert. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigten daraufhin, dass die Depletion von CRIF1 mittels siRNA *in vitro* tatsächlich zu einer deutlichen Beeinflussung von Infektionsraten und Virustitern sowie einer veränderten Ausschüttung antiviraler Zytokine führten, jedoch ließ sich die Interaktion zwischen CRIF1 und RIG-I nicht bestätigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von CRIF1 auf das antivirale Immunsystem genauer untersucht, sowie mechanistisch weiter aufgeklärt werden. Mittels siRNA-vermitteltem *knockdown* von CRIF1 konnten zunächst deutliche antivirale Effekte von CRIF1 auf Zytokinebene und Virusproduktion gezeigt werden. In einem lentiviralen, Doxycyclin-induzierbaren shRNA-System zum *knockdown* von CRIF1 ließen sich diese Daten jedoch nicht reproduzieren und es zeigte sich sogar ein proviraler Effekt von CRIF1 auf die Virusreplikation. Durch Stimulation mit einem synthetischen Imitat viraler RNA (5'-ppp-RNA) wird CRIF1 auf transkriptioneller Ebene induziert. Mittels subzellulärer Fraktionierungen und Konfokalmikroskopie wurde gezeigt, dass CRIF1 ein mitochondriales Protein ist, dessen Lokalisation von einer n'-terminalen mitochondrialen Lokalisationssequenz und einem im Normalfall maskierten nukleären Lokalisationssignal abhängig ist. *Knockdown* von CRIF1 führte zum Verlust einer intakten mitochondrialen Architektur und zur Umstellung des Zellstoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse. Murine Fibroblasten wiesen nach Doxycyclin-induzierbarem *knockout* von CRIF1 eine verminderte Expression von Atmungskettenkomplexen mit mitochondrial kodierten Untereinheiten auf.

Aus diesen Daten wurde die Hypothese abgeleitet, dass Mustererkennung des angeborenen antiviralen Immunsystems eine intakte mitochondriale ROS-Produktion und ein intaktes mitochondriales Membranpotential in virusinfizierten Zellen erfordert für eine funktionierende Signaltransduktion und Aktivierung antiviraler Genprogramme. Durch die gesteigerte Expression von CRIF1 im Rahmen einer viralen Infektion und dadurch bedingtem vermehrtem Einbau von OXPHOS-Komplexen in die innere

Mitochondrienmembran wird die antivirale zelluläre Antwort im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über erhöhte Kapazität zur ROS-Produktion gesteigert.

Die Etablierung alternativer experimenteller Systeme ist jedoch notwendig, um den Einfluss von CRIF1 auf das angeborene Immunsystem genauer zu charakterisieren. Weitere Arbeiten müssen ferner den genauen Einfluss von CRIF1 auf den zellulären Redox-Status untersuchen. Die mitochondriale Dysfunktion und der damit verbundene metabolische Phänotyp CRIF1-defizienter Zellen macht diese dabei zu einem attraktiven Modell für die Erforschung von Alterungsprozessen und Erkrankungen mit pathophysiologischer Beteiligung von Mitochondrien.

6 Literaturverzeichnis

1. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
2. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.
3. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
4. Pradeu T, Cooper EL. The danger theory: 20 years later. *Front Immunol* 2012;3:287.
5. Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2015;15:e9-e21.
6. Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2015;15:e157-70.
7. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010;140:771-6.
8. Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 2009;30:766-75.
9. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2011;7 Suppl 1:S1.
10. Rigby RE, Webb LM, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MA, Lundie RJ, Revuelta A, Davidson DJ, Diebold S, Modis Y, MacDonald AS, Jackson AP. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. *EMBO J* 2014;33:542-58.
11. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
12. Schmidt A, Endres S, Rothenfusser S. Pattern recognition of viral nucleic acids by RIG-I-like helicases. *J Mol Med (Berl)* 2011;89:5-12.
13. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
14. Schmidt A, Schwerdt T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12067-72.
15. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2015;32:48-53.
16. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009;10:1065-72.
17. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schuberth C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014;514:372-5.
18. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005;175:5260-8.
19. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. Loss of DExD/H Box RNA Helicase LGP2 Manifests Disparate Antiviral Responses. *The Journal of Immunology* 2007;178:6444-55.
20. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1512-7.

21. Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Mol Cell* 2014;55:771-81.
22. Bruns AM, Horvath CM. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* 2015;74:198-206.
23. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-8.
24. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-72.
25. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122:669-82.
26. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005;19:727-40.
27. Koshiba T, Bashiruddin N, Kawabata S. Mitochondria and antiviral innate immunity. *Int J Biochem Mol Biol* 2011;2:257-62.
28. Koshiba T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci Signal* 2011;4:ra7.
29. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M, Nibert ML, Superti-Furga G, Kagan JC. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 2010;141:668-81.
30. Patel JR, Jain A, Chou YY, Baum A, Ha T, Garcia-Sastre A. ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO Rep* 2013;14:780-7.
31. Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, Hur S. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:21010-5.
32. Peisley A, Wu B, Yao H, Walz T, Hur S. RIG-I forms signaling-competent filaments in an ATP-dependent, ubiquitin-independent manner. *Mol Cell* 2013;51:573-83.
33. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 2011;146:448-61.
34. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.
35. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 2013;38:855-69.
36. Yao H, Dittmann M, Peisley A, Hoffmann HH, Gilmore RH, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Hornung V, Rice CM, Hur S. ATP-Dependent Effector-like Functions of RIG-I-like Receptors. *Mol Cell* 2015;58:541-8.
37. Burdette DL, Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* 2013;14:19-26.
38. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013;339:786-91.
39. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013;339:826-30.

40. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Rohl I, Hopfner KP, Ludwig J, Hornung V. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 2013;498:380-4.
41. Mankan AK, Schmidt T, Chauhan D, Goldeck M, Honing K, Gaidt M, Kubarenko AV, Andreeva L, Hopfner KP, Hornung V. Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS-STING axis. *EMBO J* 2014;33:2937-46.
42. Ablasser A, Schmid-Burgk JL, Hemmerling I, Horvath GL, Schmidt T, Latz E, Hornung V. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* 2013.
43. Bridgeman A, Maelfait J, Davenne T, Partridge T, Peng Y, Mayer A, Dong T, Kaever V, Borrow P, Rehwinkel J. Viruses transfer the antiviral second messenger cGAMP between cells. *Science* 2015;349:1228-32.
44. Gentili M, Kowal J, Tkach M, Satoh T, Lahaye X, Conrad C, Boyron M, Lombard B, Durand S, Kroemer G, Loew D, Dalod M, Thery C, Manel N. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science* 2015;349:1232-6.
45. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821-32.
46. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 2007;14:1583-9.
47. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228-32.
48. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008;9:857-65.
49. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010;11:136-40.
50. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237-41.
51. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464:1357-61.
52. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9035-40.
53. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320:674-7.
54. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:847-56.
55. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology* 2010;10:210-5.
56. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 2009;10:266-72.
57. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009;458:509-13.

58. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009;458:514-8.
59. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA, Stacey KJ. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009;323:1057-60.
60. Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, Hopfner KP. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol* 2014;14:521-8.
61. Venereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 2015;6:422.
62. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 2014;14:36-49.
63. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2015;15:87-103.
64. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011;472:481-5.
65. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 2011;1:519-25.
66. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* 2014;6:40-6.
67. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007;448:816-9.
68. Malathi K, Saito T, Crochet N, Barton DJ, Gale M, Jr., Silverman RH. RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA* 2010;16:2108-19.
69. Luthra P, Sun D, Silverman RH, He B. Activation of IFN- β expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:2118-23.
70. MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 2012;12:367-82.
71. Rudick RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis. *Exp Cell Res* 2011;317:1301-11.
72. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS, Team IS. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;361:580-93.
73. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16:131-44.
74. Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M, Peters KL, Smith K, Desai A, Williams BR, Sen GC. Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J* 2010;29:1762-73.
75. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 2009;119:2399-411.
76. Scorrano L. Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur J Clin Invest* 2013;43:886-93.
77. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 1999;283:1476-81.

78. Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007;76:723-49.
79. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 2009;19:81-8.
80. Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 2000;19:1777-83.
81. Mazat JP, Ransac S, Heiske M, Devin A, Rigoulet M. Mitochondrial energetic metabolism-some general principles. *IUBMB Life* 2013;65:171-9.
82. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-44.
83. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1-13.
84. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:248-53.
85. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005;120:483-95.
86. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011;194:7-15.
87. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11715-20.
88. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 2012;48:158-67.
89. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009;284:13291-5.
90. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-41.
91. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T. Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001012.
92. Wang X, Jiang W, Yan Y, Gong T, Han J, Tian Z, Zhou R. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway. *Nat Immunol* 2014;15:1126-33.
93. Park S, Won JH, Hwang I, Hong S, Lee HK, Yu JW. Defective mitochondrial fission augments NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep* 2015;5:15489.
94. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012;36:401-14.
95. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, Eisenbarth SC, Nauseef WM, Cassel SL, Sutterwala FS. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 2013;39:311-23.
96. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 2004;75:995-1000.
97. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-7.
98. West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, Bestwick M, Duguay BA, Raimundo N, MacDuff DA, Kaech SM, Smiley JR, Means RE, Iwasaki A, Shadel GS.

- Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 2015;520:553-7.
99. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011;472:476-80.
 100. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, Sack MN, Kastner DL, Siegel RM. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 2011;208:519-33.
 101. Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li PL. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal* 2015;22:1111-29.
 102. van Bruggen R, Koker MY, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Kuijpers TW, van den Berg TK. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* 2010;115:5398-400.
 103. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011;12:222-30.
 104. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011;469:221-5.
 105. Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 2013;153:348-61.
 106. Yu J, Nagasu H, Murakami T, Hoang H, Broderick L, Hoffman HM, Horng T. Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:15514-9.
 107. Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Suzuki K, Okuda K. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14050-5.
 108. Tal MC, Iwasaki A. Autophagic control of RLR signaling. *Autophagy* 2009;5:749-50.
 109. Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2770-5.
 110. Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzengue Y, Lamarre D, Vande Velde C, Grandvaux N. Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000930.
 111. Zhao Y, Sun X, Nie X, Sun L, Tang TS, Chen D, Sun Q. COX5B regulates MAVS-mediated antiviral signaling through interaction with ATG5 and repressing ROS production. *PLoS Pathog* 2012;8:e1003086.
 112. Tattoli I, Carneiro LA, Jehanno M, Magalhaes JG, Shu Y, Philpott DJ, Arnoult D, Girardin SE. NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep* 2008;9:293-300.
 113. Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, Accavitti-Loper MA, Madden VJ, Sun L, Ye Z, Lich JD, Heise MT, Chen Z, Ting JP. NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 2008;451:573-7.
 114. Allen IC, Moore CB, Schneider M, Lei Y, Davis BK, Scull MA, Gris D, Roney KE, Zimmermann AG, Bowzard JB, Ranjan P, Monroe KM, Pickles RJ, Sambhara S, Ting JP. NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF-kappaB signaling pathways. *Immunity* 2011;34:854-65.

115. Rebsamen M, Vazquez J, Tardivel A, Guarda G, Curran J, Tschopp J. NLRX1/NOD5 deficiency does not affect MAVS signalling. *Cell Death Differ* 2011;18:1387.
116. Soares F, Tattoli I, Wortzman ME, Arnoult D, Philpott DJ, Girardin SE. NLRX1 does not inhibit MAVS-dependent antiviral signalling. *Innate Immun* 2013;19:438-48.
117. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
118. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136:642-55.
119. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
120. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
121. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008;3:e3420.
122. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-9.
123. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-5.
124. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
125. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
126. Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* 2009;136:656-68.
127. Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263-5.
128. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004;431:338-42.
129. Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding SW. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 2013;342:231-4.
130. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, Voinnet O. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013;342:235-8.
131. Li Y, Basavappa M, Lu J, Dong S, Cronkite DA, Prior JT, Reinecker HC, Hertzog P, Han Y, Li WX, Cheloufi S, Karginov FV, Ding SW, Jeffrey KL. Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. *Nat Microbiol* 2016;2:16250.
132. Jeffrey KL, Li Y, Ding SW. Reply to 'Questioning antiviral RNAi in mammals'. *Nat Microbiol* 2017;2:17053.
133. tenOever BR. Questioning antiviral RNAi in mammals. *Nat Microbiol* 2017;2:17052.
134. Backes S, Langlois RA, Schmid S, Varble A, Shim JV, Sachs D, tenOever BR. The Mammalian response to virus infection is independent of small RNA silencing. *Cell Rep* 2014;8:114-25.
135. Maillard PV, Van der Veen AG, Deddouche-Grass S, Rogers NC, Merits A, Reis ESC. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2016;35:2505-18.
136. Bogerd HP, Skalsky RL, Kennedy EM, Furuse Y, Whisnant AW, Flores O, Schultz KL, Putnam N, Barrows NJ, Sherry B, Scholle F, Garcia-Blanco MA, Griffin DE, Cullen BR. Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs. *J Virol* 2014;88:8065-76.
137. Benitez AA, Spanko LA, Bouhaddou M, Sachs D, tenOever BR. Engineered Mammalian RNAi Can Elicit Antiviral Protection that Negates the Requirement for the Interferon Response. *Cell Rep* 2015;13:1456-66.

138. Seo GJ, Kincaid RP, Phanaksri T, Burke JM, Pare JM, Cox JE, Hsiang TY, Krug RM, Sullivan CS. Reciprocal inhibition between intracellular antiviral signaling and the RNAi machinery in mammalian cells. *Cell Host Microbe* 2013;14:435-45.
139. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343-9.
140. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005;19:517-29.
141. MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2007;17:138-45.
142. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 2005;310:1817-21.
143. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115:787-98.
144. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 2013;42:217-39.
145. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
146. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200.
147. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;431:371-8.
148. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-3.
149. Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003;33:401-6.
150. Van den Haute C, Eggermont K, Nuttin B, Debyser Z, Baekelandt V. Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain. *Hum Gene Ther* 2003;14:1799-807.
151. Matsukura S. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Research* 2003;31:77e-.
152. van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FCP, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO reports* 2003;4:609-15.
153. Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 2003;77:8957-61.
154. Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* 2006;3:682-8.
155. Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1927-32.
156. Gornemann J, Hofmann TG, Will H, Muller M. Interaction of human papillomavirus type 16 L2 with cellular proteins: identification of novel nuclear body-associated proteins. *Virology* 2002;303:69-78.
157. Chung HK, Yi YW, Jung NC, Kim D, Suh JM, Kim H, Park KC, Song JH, Kim DW, Hwang ES, Yoon SH, Bae YS, Kim JM, Bae I, Shong M. CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle. *J Biol Chem* 2003;278:28079-88.

158. Park KC, Song KH, Chung HK, Kim H, Kim DW, Song JH, Hwang ES, Jung HS, Park SH, Bae I, Lee IK, Choi HS, Shong M. CR6-interacting factor 1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and inhibits its transactivation. *Mol Endocrinol* 2005;19:12-24.
159. Ran Q, Hao P, Xiao Y, Xiang L, Ye X, Deng X, Zhao J, Li Z. CRIF1 interacting with CDK2 regulates bone marrow microenvironment-induced G0/G1 arrest of leukemia cells. *PLoS One* 2014;9:e85328.
160. Kwon MC, Koo BK, Moon JS, Kim YY, Park KC, Kim NS, Kwon MY, Kong MP, Yoon KJ, Im SK, Ghim J, Han YM, Jang SK, Shong M, Kong YY. Crif1 is a novel transcriptional coactivator of STAT3. *EMBO J* 2008;27:642-53.
161. Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 2010;29:3020-32.
162. Kim SJ, Kwon MC, Ryu MJ, Chung HK, Tadi S, Kim YK, Kim JM, Lee SH, Park JH, Kweon GR, Ryu SW, Jo YS, Lee CH, Hatakeyama H, Goto Y, Yim YH, Chung J, Kong YY, Shong M. CRIF1 is essential for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane. *Cell Metab* 2012;16:274-83.
163. Ebert O, Shinozaki K, Huang TG, Savontaus MJ, Garcia-Sastre A, Woo SL. Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer Res* 2003;63:3605-11.
164. Ebert O, Shinozaki K, Kournioti C, Park MS, Garcia-Sastre A, Woo SL. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res* 2004;64:3265-70.
165. Mahy BWJ, Kangro HO. *Virology methods manual*. London ; San Diego: Academic Press; 1996.
166. Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology* 2007;36:184-204.
167. Gersting SW, Lotz-Havla AS, Muntau AC. Bioluminescence resonance energy transfer: an emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells. *Methods Mol Biol* 2012;815:253-63.
168. Claros MG, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 1996;241:779-86.
169. Fenner BJ, Scannell M, Prehn JH. Expanding the substantial interactome of NEMO using protein microarrays. *PLoS One* 2010;5:e8799.
170. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21:635-7.
171. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 2006;12:1179-87.
172. Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 2006;3:199-204.
173. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003;34:263-4.
174. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005;11:263-70.

175. Marques JT, Devosse T, Wang D, Zamanian-Daryoush M, Serbinowski P, Hartmann R, Fujita T, Behlke MA, Williams BR. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:559-65.
176. Whitehead KA, Dahlman JE, Langer RS, Anderson DG. Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011;2:77-96.
177. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441:537-41.
178. Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 2009;27:549-55.
179. Riesbeck K, Bredberg A, Forsgren A. Ciprofloxacin does not inhibit mitochondrial functions but other antibiotics do. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990;34:167-9.
180. Luger AL, Sauer B, Lorenz NI, Engel AL, Braun Y, Voss M, Harter PN, Steinbach JP, Ronellenfitsch MW. Doxycycline Impairs Mitochondrial Function and Protects Human Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death: Implications of Using Tet-Inducible Systems. *Int J Mol Sci* 2018;19.
181. Wu ZC, Wang X, Wei JC, Li BB, Shao DH, Li YM, Liu K, Shi YY, Zhou B, Qiu YF, Ma ZY. Antiviral activity of doxycycline against vesicular stomatitis virus in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 2015;362.
182. Suh JH, Shong M, Choi HS, Lee K. CR6-interacting factor 1 represses the transactivation of androgen receptor by direct interaction. *Mol Endocrinol* 2008;22:33-46.
183. Oh NS, Yoon SH, Lee WK, Choi JY, Min do S, Bae YS. Phosphorylation of CKBBP2/CRIF1 by protein kinase CKII promotes cell proliferation. *Gene* 2007;386:147-53.
184. Kwon MC, Koo BK, Kim YY, Lee SH, Kim NS, Kim JH, Kong YY. Essential role of CR6-interacting factor 1 (Crif1) in E74-like factor 3 (ELF3)-mediated intestinal development. *J Biol Chem* 2009;284:33634-41.
185. Kang HJ, Hong YB, Kim HJ, Bae I. CR6-interacting factor 1 (CRIF1) regulates NF-E2-related factor 2 (NRF2) protein stability by proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 2010;285:21258-68.
186. Rao S, Gerbeth C, Harbauer A, Mikropoulou D, Meisinger C, Schmidt O. Signaling at the gate: phosphorylation of the mitochondrial protein import machinery. *Cell Cycle* 2011;10:2083-90.
187. Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eyrich B, Zahedi RP, Stojanovski D, Schonfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* 2011;144:227-39.
188. Koc EC, Cimen H, Kumcuoglu B, Abu N, Akpinar G, Haque ME, Spremulli LL, Koc H. Identification and characterization of CHCHD1, AURKAIP1, and CRIF1 as new members of the mammalian mitochondrial ribosome. *Front Physiol* 2013;4:183.
189. Ng AC, Baird SD, Screaton RA. Essential role of TID1 in maintaining mitochondrial membrane potential homogeneity and mitochondrial DNA integrity. *Mol Cell Biol* 2014;34:1427-37.
190. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3801-4.
191. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnfsky EJ, Larner AC. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 2009;323:793-7.

192. Tammineni P, Anugula C, Mohammed F, Anjaneyulu M, Lerner AC, Sepuri NB. The import of the transcription factor STAT3 into mitochondria depends on GRIM-19, a component of the electron transport chain. *J Biol Chem* 2013;288:4723-32.
193. Ryu MJ, Kim SJ, Kim YK, Choi MJ, Tadi S, Lee MH, Lee SE, Chung HK, Jung SB, Kim HJ, Jo YS, Kim KS, Lee SH, Kim JM, Kweon GR, Park KC, Lee JU, Kong YY, Lee CH, Chung J, Shong M. Crif1 deficiency reduces adipose OXPHOS capacity and triggers inflammation and insulin resistance in mice. *PLoS Genet* 2013;9:e1003356.
194. Nagar H, Jung SB, Kwon SK, Park JB, Shong M, Song HJ, Jeon BH, Irani K, Kim CS. CRIF1 deficiency induces p66shc-mediated oxidative stress and endothelial activation. *PLoS One* 2014;9:e98670.
195. Nagar H, Jung SB, Ryu MJ, Choi SJ, Piao S, Song HJ, Kang SK, Shin N, Kim DW, Jin SA, Jeong JO, Irani K, Jeon BH, Shong M, Kweon GR, Kim CS. CR6-Interacting Factor 1 Deficiency Impairs Vascular Function by Inhibiting the Sirt1-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway. *Antioxid Redox Signal* 2017;27:234-49.
196. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 1999;402:309-13.
197. Tan JA, Bai S, Grossman G, Titus MA, Ford OH, Pop EA, Smith GJ, Mohler JL, Wilson EM, French FS. Mechanism of androgen receptor corepression by CKbetaBP2/CRIF1, a multifunctional transcription factor coregulator expressed in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:302-13.
198. Yan HX, Zhang YJ, Zhang Y, Ren X, Shen YF, Cheng MB, Zhang Y. CRIF1 enhances p53 activity via the chromatin remodeler SNF5 in the HCT116 colon cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2017;1860:516-22.
199. Zhuang R, Lu D, Zhuo J, Zhang X, Wang K, Wei X, Wei Q, Wang W, Xie H, Zhou L, Xu X, Zheng S. CR6-interacting factor 1 inhibits invasiveness by suppressing TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017;8:94759-68.
200. Nakayama K, Nakayama N, Wang TL, Shih IM. NAC-1 controls cell growth and survival by repressing transcription of Gadd45GIP1, a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* 2007;67:8058-64.
201. Jinawath N, Vasoontara C, Yap KL, Thiaville MM, Nakayama K, Wang TL, Shih IM. NAC-1, a potential stem cell pluripotency factor, contributes to paclitaxel resistance in ovarian cancer through inactivating Gadd45 pathway. *Oncogene* 2009;28:1941-8.
202. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;124:269-70.
203. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-14.
204. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
205. Vahedi S, Chueh FY, Chandran B, Yu CL. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) interacts with CR6-interacting factor 1 (CRIF1) in mitochondria to repress oxidative phosphorylation. *BMC Cancer* 2015;15:551.
206. Vahedi S, Chueh FY, Dutta S, Chandran B, Yu CL. Nuclear lymphocyte-specific protein tyrosine kinase and its interaction with CR6-interacting factor 1 promote the survival of human leukemic T cells. *Oncol Rep* 2015;34:43-50.
207. Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol* 2013;34:431-9.
208. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;352:aaf1098.

209. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shephardson KM, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Martens JH, Rao NA, Aghajani-Refah A, Manjeri GR, Li Y, Ifrim DC, Arts RJ, van der Veer BM, Deen PM, Logie C, O'Neill LA, Willems P, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Ng A, Joosten LA, Wijmenga C, Stunnenberg HG, Xavier RJ, Netea MG. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 2014;345:1250684.
210. Odegaard JI, Chawla A. The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity* 2013;38:644-54.
211. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 2015;25:771-84.
212. Pantel A, Teixeira A, Haddad E, Wood EG, Steinman RM, Longhi MP. Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation. *PLoS Biol* 2014;12:e1001759.
213. Tal MC, Iwasaki A. Mitoxosome: a mitochondrial platform for cross-talk between cellular stress and antiviral signaling. *Immunol Rev* 2011;243:215-34.
214. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2011;11:389-402.
215. Jung SB, Choi MJ, Ryu D, Yi HS, Lee SE, Chang JY, Chung HK, Kim YK, Kang SG, Lee JH, Kim KS, Kim HJ, Kim CS, Lee CH, Williams RW, Kim H, Lee HK, Auwerx J, Shong M. Reduced oxidative capacity in macrophages results in systemic insulin resistance. *Nat Commun* 2018;9:1551.
216. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009;460:587-91.
217. Piao S, Lee JW, Nagar H, Jung SB, Choi S, Kim S, Lee I, Kim SM, Shin N, Lee YR, Lee SD, Park JB, Irani K, Won M, Hur GM, Jeon BH, Kim DW, Kim CS. CR6 interacting factor 1 deficiency promotes endothelial inflammation by SIRT1 downregulation. *PLoS One* 2018;13:e0192693.
218. Martin SD, McGee SL. The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:1303-12.
219. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58:1497-507.
220. Dominic EA, Ramezani A, Anker SD, Verma M, Mehta N, Rao M. Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease. *Heart* 2014;100:611-8.
221. Johri A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342:619-30.
222. Bratic I, Trifunovic A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:961-7.
223. Shin J, Lee SH, Kwon MC, Yang DK, Seo HR, Kim J, Kim YY, Im SK, Abel ED, Kim KT, Park WJ, Kong YY. Cardiomyocyte specific deletion of Crif1 causes mitochondrial cardiomyopathy in mice. *PLoS One* 2013;8:e53577.

7 Abkürzungsverzeichnis

AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5A1	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1</i>
BAK	<i>BCL-2 antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
BH3	<i>BCL-2 homology 3</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRET	Biolumineszenz-Resonanz Energie-Transfer
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
cDNA	komplementäre DNA
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
cGMP-AMP, cGAMP	<i>cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CRIF1	<i>cytokine-responsive 6-interacting factor 1</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
ECAR	<i>extracellular acidification rate</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GADD45GIP1	<i>growth arrest and DNA damage-inducible 45 γ interacting protein 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HIF-1α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
hRLuc	Renilla Luciferase
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
HSP60	<i>heat shock protein 60</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFNα-Rezeptor
IHF	<i>integration host factor</i>
IKK	<i>inhibitor of κB kinase</i>

IL	Interleukin
Int	Integrase
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation antigen 5</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
miRNA	<i>micro-RNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MTCO1	<i>mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTS	mitochondriale <i>targeting</i> -Sequenz
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NAC-1	<i>nucleus accumbens 1</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NDUFB8	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1β subcomplex subunit 8</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>
NLRP	<i>NLR family, pyrin domain containing</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOX	NADPH-Oxidase-System
NRF2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2</i>
OAS	Oligoadenylat-Synthase
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>plaque-forming units</i>
PKR	RNA-aktivierte Proteinkinase

PLINP	<i>Papillomavirus L2-interacting nuclear protein</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
ppp	Triphosphat
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time-PCR</i>
RIG-I	<i>retinoid acid inducible genes I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLR	<i>RIG-I-like-Rezeptor</i>
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDHB	<i>succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
TANK	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase</i>
TCID ₅₀	<i>50 % tissue culture infective dose</i>
TID1	<i>tumorous imaginal disc 1</i>
TIR	<i>Toll/IL-1-receptor homology</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
TRAF	<i>TNFα receptor-associated factor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing Interferon-β</i>
UQCRC2	<i>ubiquinol cytochrome c reductase complex subunit 2</i>
UTR	untranslatierte Region
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Plaque Assay.....	36
Abbildung 2:	Haarnadelstruktur der in dieser Arbeit verwendeten shRNAs	37
Abbildung 3:	siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von CRIF1 führt zu verminderter Ausschüttung antiviraler Zytokine nach Virusinfektion und Stimulation mit 5'-ppp-RNA	41
Abbildung 4:	Gesteigerte Virusreplikation in infizierten Zellen nach siRNA-vermitteltem <i>knockdown</i> von CRIF1	42
Abbildung 5:	Überexpression von CRIF1 führt zu vermehrter Ausschüttung von IP-10.....	43
Abbildung 6:	Stimulation mit 5'-ppp-RNA induziert CRIF1-mRNA	44
Abbildung 7:	<i>Knockdown</i> -Effektivität lentiviraler shRNAs in unterschiedlichen Zelllinien	45
Abbildung 8:	shRNA- <i>knockdown</i> von CRIF1 führt nicht zu verminderter Expression von IP-10 oder IFN- β nach Stimulation mit 5'-ppp-RNA, poly(I:C) oder Sendai-Virus	47
Abbildung 9:	shRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von CRIF1 führt zu verminderter Virusproduktion in infizierten Zellen.....	49
Abbildung 10:	Subzelluläre Fraktionierungen von 1205lu-Zellen und MEFs.....	50
Abbildung 11:	CRIF1 besitzt eine mitochondriale <i>targeting</i> -Sequenz und ein nukleäres Lokalisationssignal	51
Abbildung 12:	Lokalisation von CRIF1 in Abhängigkeit von der MTS und dem NLS	52
Abbildung 13:	Kein Nachweis einer Interaktion von Myc-CRIF1 und Flag-NEMO mittels Co-Immunpräzipitation	54
Abbildung 14:	BRET von CRIF1 mit STAT3 und NEMO	55
Abbildung 15:	BRET Titrationsexperimente	56
Abbildung 16:	Veränderte Mitochondrien-Morphologie nach <i>knockdown</i> von CRIF1	57
Abbildung 17:	Verlust von CRIF1 steigert die basale <i>extracellular acidification rate</i> (ECAR) und reduziert die <i>oxygen consumption rate</i> (OCR)	58
Abbildung 18:	Expression von Atmungsketten-Komplexen nach Cre/loxP- <i>knockout</i> von CRIF	59
Abbildung 19:	Modell für die Rolle von CRIF1 in der angeborenen antiviralen Immunität	71

9 Danksagung

Bei Professor Stefan Endres möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, in dem inspirierenden und familiären Umfeld seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

Meinem Doktorvater Professor Simon Rothenfußer danke ich für die Betreuung, seine ansteckende wissenschaftliche Begeisterung sowie seine Beratung in vielen beruflichen Fragen.

Bei meinen Postdocs Dr. Andreas Schmidt und Dr. Christian Wißkirchen bedanke ich mich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und ihre kreative, motivierende Art.

Maßgeblich beigetragen zum Gelingen dieser Arbeit hat Simone Willms, der ich für ihre Hilfe in allen technischen Belangen und ihr offenes Ohr danke.

Allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden möchte ich danken für die freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre und die gegenseitige Unterstützung.

10 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lukas August Macke, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakterisierung von CRIF1 als Regulator der angeborenen antiviralen Immunität

selbständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 23.11.2020

L. A. Macke